

FABIOLA MAZZARO AKAISHI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE ESGOTO DOMÉSTICO
TRATADO E NÃO-TRATADO EM BIVALVE MARINHO *Mytilus edulis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular,
como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Biologia Celular.

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. De Oliveira Ribeiro

Co-orientadora: Dr. Sylvie St-Jean

**CURITIBA
2007**

FABIOLA MAZZARO AKAISHI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE ESGOTO DOMÉSTICO
TRATADO E NÃO-TRATADO EM BIVALVE MARINHO *Mytilus edulis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, como requisito parcial à obtenção do grau de doutor em Biologia Celular, área de concentração Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira
Ribeiro

Co-orientadora: Dr. Sylvie St-Jean.

**CURITIBA
2007**

Aos meus pais, Guido e Neusa

AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela vida e coragem durante os momentos difíceis nesses 4 anos de estudo.

Ao meu eterno namorado e esposo **Matthew Hardy** por todo amor, carinho, respeito, compreensão, paciência, força, apoio e incentivo. Você foi muito importante durante esse período da minha vida.

À minha amada e estimada **família**, por sempre me apoiar, me incentivar e pela paciência, força e exemplo.

Ao meu orientador, prof. **Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro** pela amizade, confiança, estímulo, apoio, orientação e oportunidades durante essa fase da minha formação profissional.

À minha co-orientadora, **Dra. Sylvie St-Jean** pela orientação, apoio, amizade e pela oportunidade de desenvolver um projeto em colaboração com o Canadá. Thank you.

Ao **Environment Canada, Moncton, NB** pelo espaço e equipamentos emprestados durante desenvolvimento do projeto, especialmente pela amizade de **Marc Bernier, Ken Doe, Art Cook, Paula Jackman, Troy Steeves, Martin Leger, Abbey Ouellet, Louise Boulter, Angie Morin, Cathy Cormie, Vicent Mercier, Patrice Godin, Bernard Richard** e todos os outros funcionários do Instituto que me acolheram. Thank you.

Ao município de Vancouver - **GVRD (Great Vancouver Regional District)** pelo apoio financeiro e pela confiança depositada no meu trabalho e **Farida Bishay** pela contribuição na elaboração e desenvolvimento do projeto e artigos e pelo apoio financeiro e logístico. Thank you.

Ao colega **Chad Boyko** pela ajuda no desenvolvimento do experimento e elaboração do design experimental, assim como durante o trabalho de campo. Thank you.

Ao **Doug and Dave DesBarre** pela ajuda no barco e estadia durante a fase de campo. Thank you.

À **estação de tratamento de esgoto e município de New Glasgow**, Nova Scotia, Canadá, por permitir a utilização do espaço e uso do efluente para o experimento. Thank you.

Aos professores **Yves Poussart** e **Erick Bataller** da **Université de Moncton** pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura. Merci beaucoup.

Aos amigos **Simon Courtenay**, **Michelle Maillet**, **Anne Veniot** e **Chantal Coomber** por me ajudar em muitos momentos. Thank you.

Ao Prof. **Ms. Marco A. F. Randi** por toda ajuda na parte de histologia.

A **todos os professores do Programa de Pós-graduação** em Biologia Celular e Molecular, por toda contribuição na minha formação acadêmica.

Às minhas amigas, **Ana Cláudia**, **Helen**, **Simone Dala Rosa**, **Simone Umbria**, **Viviane Prodócimo** que mesmo distante continuaram me ouvindo e dividindo momentos de desabafos e alegrias.

A todos meus **colegas do curso de pós-graduação** e do **laboratório de Toxicologia Celular**, em especial a Fabíola Valdez e Inês, por todos os momentos compartilhados e pela ajuda mesmo distante.

E à **Universidade Federal do Paraná** por me acolher desde 1996 quando iniciei o curso de graduação.

“A mente que se abre a uma nova idéia
jamais volta ao seu tamanho original”.

Albert Einstein

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	iix
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUÇÃO GERAL.....	02
OBJECTIVO GERAL.....	06
CAPÍTULO I – Avaliação dos efeitos do esgoto doméstico não tratado em <i>Mytilus edulis</i> através de bioensaio.....	07
1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	13
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Padronização de metodologias e experimento.....	14
3.1.1. Padronização da expressão dos resultados dos testes imunológicos.....	14
3.1.2. Padronização da medida da produção do óxido nítrico.....	14
3.1.3. Padronização da medida da atividade da catalase.....	15
3.1.4. Padronização do experimento.....	15
3.2. Central de Tratamento de Esgoto.....	16
3.3. Modelo Biológico	18
3.4. Desenho Experimental	19
3.5. Extração da Hemolinfa.....	22
3.6. Ensaios Imunológicos, Bioquímicos e Morfológicos.....	22
3.6.1. Atividade Fagocítica.....	23
3.6.2. Medida da Produção do Peróxido de Hidrogênio.....	24
3.6.3. Viabilidade Celular e Contagem de Hemócitos.....	24
3.6.4. Medida da Produção de Óxido Nítrico.....	24
3.6.5. Microscopia de luz.....	25
3.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	26
3.6.7. Medida da Atividade da Catalase.....	26
3.7. Desafio Bacteriológico.....	27
3.8. Análises Estatísticas.....	29
4 RESULTADOS	31
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÃO	55
CAPÍTULO II – Avaliação dos efeitos tóxicos de esgoto tratado e não-tratado em <i>Mytilus edulis</i> expostos em regiões estuarinas, baseado nos dados do bioensaio	56
1 INTRODUÇÃO	57
2 OBJETIVO ESPECÍFICO	60
3 MATERIAL E MÉTODOS	61
3.1. Área de estudo.....	61
3.2. Estudo in situ.....	63
3.3. Construção das gaiolas.....	64

3.4. <i>Extração da hemolinfa</i>	64
3.5. <i>Ensaio Imunológicos e Bioquímicos</i>	65
3.6. <i>Histopatologia</i>	65
3.7. <i>Desafio Bacteriológico</i>	65
3.8. <i>Análises estatística</i>	65
4 RESULTADOS	67
5 DISCUSSÃO	78
6 CONCLUSÃO	85
DISCUSSÃO GERAL.....	86
CONCLUSÃO GERAL.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
ANEXOS	

Lista de Tabelas

Capítulo I

TABELA 1	Média da medida da concentração de amônia total e não-ionizada em amostras de esgoto.....	31
TABELA 2	Prevalência (%) de <i>M. edulis</i> apresentando lesões em brânquias.....	41
TABELA 3	Prevalência (%) de <i>M. edulis</i> apresentando lesões em glândulas digestivas.....	42

Capítulo II

TABELA 1	Prevalência (%) de <i>M. edulis</i> apresentando lesões em brânquias após 90 dias expostos <i>in situ</i> a efluentes de esgoto não-tratado, tratado e referência.....	76
TABELA 2	Prevalência (%) de <i>M. edulis</i> apresentando lesões em brânquias após 90 dias expostos <i>in situ</i> a efluentes de esgoto não-tratado, tratado e referência.....	77

Lista de Figuras

Capítulo I

Figura 1 -	Estação Central de Tratamento de Esgoto da cidade de Treton, Nova Scotia, Canadá.....	17
Figura 2 -	Espécie estudada, <i>Mytilus edulis</i>	19
Figura 3 -	Laboratório móvel usado para o experimento.....	21
Figura 4 -	Ilustração dos tanques (100l) contendo as 4 concentrações de esgoto não-tratado	21
Figura 5 -	Desenho do experimento.....	22
Figura 6 -	Cultura de bactéria (<i>Listonella anguillarum</i>).....	29
Figura 7 -	Atividade fagocítica em hemócitos de <i>M. edulis</i>	32
Figura 8 -	Produção de peróxido de hidrogênio em hemócitos de <i>M. edulis</i>	33
Figura 9 -	Atividade da enzima catalase em glândula digestiva de <i>M. edulis</i>	34
Figura 10 -	Produção do óxido nítrico em hemócitos de <i>M. edulis</i>	35
Figura 11 -	Contagem do número de hemócitos em hemolinfa de <i>M. edulis</i>	37
Figura 12 -	Viabilidade celular em hemócitos de <i>M. edulis</i>	37
Figura 13 -	Resultado do desafio bacteriológico e índice de mortalidade (%) de <i>M. edulis</i> por tratamento, após 24 h infectados com <i>L. anguillarum</i>	38
Figura 14 -	Microscopia de luz de brânquias em <i>M. edulis</i>	43
Figura 15 -	Microscopia de luz de glândula digestiva em <i>M. edulis</i>	44
Figura 16 -	Índice de lesão em brânquias (A) e glândula digestiva (B)	

	de <i>M. edulis</i>	45
Figura 17 -	Número de grânulos de lipofuscina por mm ² no endotélio de brânquias de <i>M. edulis</i>	46
Capítulo II		
Figura 1 -	Mapa da região estuarina do Porto de <i>Pictou</i>	62
Figura 2 -	Montagem das gaiolas usadas no estudo.....	63
Figura 3 -	Atividade fagocítica em hemócitos de <i>M. edulis</i>	68
Figura 4 -	Produção de peróxido de hidrogênio em hemócitos de <i>M. edulis</i>	68
Figura 5 -	Produção do óxido nítrico em hemócitos de <i>M. edulis</i>	69
Figura 6 -	Atividade da enzima catalase em glândula digestiva de <i>M. edulis</i>	70
Figura 7 -	Contagem do número de hemócitos em hemolinfa de <i>M. edulis</i>	70
Figura 8 -	Efeito da pré-exposição (90 dias) a ER1, ER2, ER3, PS1, PS2, PS3, REF1, REF2 na capacidade de <i>M. edulis</i> eliminar bactéria	71
Figura 9 -	Número de grânulos de lipofuscina por mm ² no endotélio de brânquias de <i>M. edulis</i>	73
Figura 10 -	Microscopia de luz de brânquias e glândula digestiva em <i>M. edulis</i>	74
Figura 11	Índice de lesão em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de <i>M. edulis</i>	75

Lista de Abreviaturas

ALFAC – fixador a base de álcool, fomol e ácido acético
BaPMo – Benzo(a)pireno monooxidase
BHA - Aditivo hidroxianisol butilato
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DBO – Demanda biológica de oxigênio
DBT – Di-butil- estanho (di-butyl-tin)
DDT – dicloro-difenil-tricloroetano
DEHP – Bis (2-etilhexil) fetalato
EROD - 7- etoxiresorufina – O – dietilase
ER1 – *East River 1*
ER 2 - *East River 2*
ER3 – *East River 3*
EROs – Espécies reativas de oxigênio
ERPAS – *East River Pollution Abatement System*
HCB - Hexaclorobenzeno
HPA – Hidrocarboneto policíclico aromático
H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPS - Lipopolissacarídeo
MXR – *Multixenobiotic resistant*
NO – *Nitric oxide*
O₂⁻ - Superóxido oxigênio
OH⁻ - radical hidroxila
PA – *Phagocytic activity*
PBDEs – *Polibrominate biphenyl eter*
PCBs – *Polychlorinate biphenyl*
PMA - *Phorbol myristate acetate*
PS1 – *Pictou sewage 1*
PS2 – *Pictou sewage 2*
PS3 – *Pictou sewage 3*
PVC – Poli cloreto de vinila
RE – *Receiving environment*
REF 1 – Área referência 1
REF 2 – Área referência 2
SDBS – Sódio sulfatado dodecil-benzeno
TBS – Tampão trizma (*Trizma buffer solution*)
TBT - Tributil-estanho (Tributyltin)
TSA – Ágar de soja tripticase (*trypticase soya agar*)
USEPA – Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (*US Environment Protection Agency*)

RESUMO

O presente estudo traz novas informações sobre a resposta imunológica de *Mytilus edulis* após exposição ao esgoto tratado e não-tratado, relacionando as respostas imunes com um parâmetro de maior relevância ecológica, tal como resistência a patógenos. O objetivo geral foi verificar os possíveis efeitos do esgoto no sistema imune (fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e resistência a doença) e na estrutura de tecidos (brânquias e glândula digestiva), através de bioensaio e estudo *in situ* em uma região estuarina. Um experimento semi-estático foi desenvolvido na estação de tratamento de esgoto de *New Glasgow, NS, Canadá*. Os mexilhões foram expostos por 21 dias a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não-tratado e a água salgada artificial (grupo controle). As coletas ocorreram após 7, 14 e 21 dias de exposição. Para o estudo de campo, 8 áreas foram selecionadas no Porto de Pictou e no Rio Leste, Nova Scotia, Canadá. Estas áreas obedeceram a um gradiente de diluição à jusante e montante a desembocadura de esgoto tratado e não tratado. Os mexilhões foram colocados em gaiolas e expostos às 8 áreas por 90 dias (Maio a Julho 2005). A eficiência em eliminar patógenos foi testada em *M. edulis* (do estudo de campo e laboratório). Para isso os exemplares foram infectados com a bactéria *Listonella anguillarum* por 24 h e o número de bactérias presentes na hemolinfa foi contado. Os resultados do bioensaio demonstraram que as altas concentrações de esgoto não-tratado modularam as respostas imunes do *M. edulis*, através do aumento da fagocitose e produção de H_2O_2 e óxido nítrico durante 14 dias de exposição e uma inibição desses processos após 21 dias, exceto para a produção de H_2O_2 , a qual se manteve alta mesmo após o 14º dia. No estudo de campo foi observado que indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto não-tratado apresentaram um aumento na fagocitose e produção de H_2O_2 e óxido nítrico, seguido de uma diminuição no número de hemócitos. O desafio bacteriológico demonstrou que os animais pré-expostos ao esgoto 100% morreram após 24 h quando infectados por *L. anguillarum*, enquanto que os expostos a 50% eliminaram a bactéria, mas 30% desses animais morreram após 24 h de exposição. Animais do grupo controle, 12,5% e 25% eliminaram bactérias, mas não ocorreram mortes durante o desafio. Nenhuma diferença estatística foi observada entre os animais pré-expostos às áreas receptoras de esgoto (estudo de campo) após infecção bacteriana. As lesões observadas em brânquias em ambos os estudos foram: infiltração dos hemócitos no endotélio, proliferação do epitélio, fusão lamelar, sinus hemolinfático dilatado, enquanto para glândula digestiva foram observadas: vacuolização celular, lesão similar a necrose e desorganização do epitélio. Resumindo, o esgoto não-tratado afetou o sistema imune de *M. edulis* durante 21 dias de exposição em laboratório e os efeitos refletiram a capacidade dos moluscos em eliminar os patógenos. Já no estudo de campo, houve uma modulação do sistema imune em *M. edulis* expostos às áreas receptoras do esgoto não-tratado, mas essa modulação não foi refletida na resistência desses indivíduos aos patógenos testados.

ABSTRACT

This study provides new information on the response of the immune system of *Mytilus edulis* exposed to untreated and treated sewage, linking immune response to ecologically relevant endpoints such as disease resistance. Our goal was to assess the potential effects of sewage on the immune system (phagocytic activity and production of cytotoxic metabolites, disease resistance) and morphology of gills and digestive glands of mussels through a bioassay and field study in an estuarine receiving environment (RE). A semi-static experiment was developed in a wastewater treatment plant in New Glasgow, NS Canada. Mussels were exposed for 21 days to 12.5%, 25%, 50% and 100% of untreated sewage and artificial seawater control. Sampling occurred after 7, 14 and 21 days of exposure. In the field study, eight sites were selected in East River and Pictou Harbour, NS, following a gradient of dilution, positioned upstream and downstream of sewage effluents outfalls. Caged mussels were exposed to the RE for 90 days (May to July 2005). Mussels were challenged to test their efficiency at eliminating the bacteria *Listonella anguillarum* in the bioassay and field studies. The bioassay results showed that higher concentrations of untreated sewage could modulate the immune system of mussels through an increased of phagocytic activity (PA), nitric oxide (NO) and hydrogen peroxide (H_2O_2) production during 14 days of exposure, and decreased phagocytic activity and production at 21 days, with the exception of H_2O_2 production which was high even at 21 days. Mussels exposed to untreated sewage RE also presented a high PA, NO and H_2O_2 production and lower number of haemocytes compared to mussels from reference sites. In the bacterial challenge, mussels pre-exposed to 100% sewage died 24 hours after being infected with *L. anguillarum*, while mussels pre-exposed to 50% eliminated bacteria, but showed 30% mortality. Mussels from the control, 12.5% and 25% groups eliminated bacteria and no mortality was observed. No significant difference was observed in bacterial clearance in mussels exposed to effluents in the RE. The lesions observed in gills in both studies were: infiltration of haemocytes in the endothelium, epithelium proliferation, lamellar fusion and dilated haemolymphatic sinus. In summary, untreated municipal wastewater affected the immune system of mussels during 21 days of exposure and the effects were reflected in their capability to resist pathogens. An immune modulation was observed in mussels exposed to untreated sewage in a RE, but this modulation was not reflected in the mussel's capability in eliminating pathogens.

I. INTRODUÇÃO GERAL

A água é um dos recursos naturais mais utilizados pelo homem, essencial para sobrevivência das espécies, mas também é utilizada para outros fins, assim sendo, a qualidade da água que chega aos nossos lares é um fator decisivo para o controle e a prevenção de doenças. Por outro lado, a utilização da água traz outras conseqüências, como a geração de esgotos sanitários, resultando em impactos sobre o ambiente natural e na maioria das vezes ao próprio homem. Neste caso, a coleta e tratamento de esgoto sanitário são fundamentais para garantir a qualidade de vida da população humana. Entretanto, boa parte do esgoto coletado não é tratado, sendo frequentemente lançado diretamente nos corpos d'água, tornando-se responsável por grande parte da poluição dos corpos d'água continentais, costeiros e oceânicos. O esgoto, mesmo tratado, é considerado uma fonte comum de poluição para o ambiente aquático, uma vez que estudos demonstraram que muitos dos sistemas de tratamento não são eficientes em eliminar várias substâncias químicas presentes no esgoto (BOYD et al., 2003; FERRARI et al., 2003).

Acredita-se que até o ano de 2050 a população mundial chegará a 9,3 bilhões de habitantes, superando em três vezes a população de 1960 (US BUREAU OF THE CENSUS, 2003). Criar soluções para melhorar e implantar tratamentos de esgoto será crucial para a preservação dos recursos hídricos, e principalmente da água potável. Esta preocupação começou recentemente (últimas décadas), mas mesmo em países desenvolvidos ainda não se têm sistemas de tratamento de esgoto adequado informações científicas sobre os reais danos causados pelo despejo indiscriminado de esgoto nos ambientes aquáticos. Além da qualidade da água potável, o despejo do esgoto especialmente o não tratado em rios e mares traz consigo o custo social e econômico, através do fechamento de áreas de pesca e recreação e perda de atividade turística, além dos prováveis efeitos tóxicos para a biota aquática.

No Brasil, o sistema de saneamento e tratamento de águas é um setor que continua em situação precária comparado com países desenvolvidos. De acordo com a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico realizada em 2000, 14% da população

urbana brasileira não tem acesso ao abastecimento público de água. Isso significa que 2,1% dos municípios não recebem abastecimento de água, e somente 49% da população é atendida com serviços de coleta de esgoto e desse percentual apenas cerca de 10% de todo esgoto produzido recebe algum tipo de tratamento (IBGE, 2004).

A falta de estrutura para tratar o esgoto produzido, e também a insuficiência de informação sobre os reais efeitos causados pelo esgoto despejado no ambiente aquático foram os principais fatores que motivaram este estudo que tem como principal foco o desenvolvimento de metodologias que possam ser aplicadas em campo e em laboratório no estudo e controle deste problema tanto no Brasil como no Canadá. Além disso, muito tem sido discutido sobre a regulamentação do despejo de esgoto tratado e não tratado em ambientes aquáticos no Canadá, assim este estudo também está sendo uma tentativa de desenvolver ferramentas e modelos experimentais que possam ajudar em futuros estudos de monitoramento de áreas receptoras de esgoto.

Apesar de o Canadá ser o segundo maior país em extensão e possuir uma população de apenas 31.559 milhões de habitantes (STATISTIC CANADA, 2005), sua extensa atividade industrial contribui para a produção e o despejo de produtos químicos no ambiente natural. Estes produtos são muitas vezes despejados sem nenhum tratamento prévio nos sistemas de esgoto, podendo até retornar posteriormente ao uso doméstico sem o tratamento adequado, ou simplesmente serem lançados nos ambientes aquáticos fluviais ou costeiros (NATIONAL WATER RESEARCH INSTITUTE, 2003). Em 1999, 74% da população canadense possuíam serviço de coleta de esgoto, 97% desse número apresentam algum tipo de tratamento de esgoto (ENVIRONMENT CANADA, 1999), mas esses valores concentram-se nas províncias de Ontário e Quebec. Por outro lado, mais de 600.000 pessoas distribuídas em 194 municípios da região Atlântica do Canadá, incluindo a cidade de Pictou (área de estudo), despejam sua produção diária de esgoto em rios, baías e estuários, sem nenhum tipo de tratamento (NANTEL, 1996).

Um relatório desenvolvido pelo Environment Canada em 2001, destaca cinco categorias de substâncias presentes no esgoto consideradas potenciais poluente do ambiente aquático. O primeiro grupo é composto de partículas sólidas suspensas na

água, as quais podem modificar a transparência da mesma, afetando áreas usadas para a recreação, além de diminuir a quantidade de luz na coluna d'água podendo afetar plantas e animais do fundo de rios, lagos ou estuários. O segundo grupo é composto pelos patógenos (bactérias e vírus), os quais podem causar contaminação em áreas de aquacultura, ou mesmo áreas de recreação ou água potável. Lixo orgânico faz parte do terceiro grupo, e quando em alta quantidade pode alterar os valores de oxigênio dissolvido na água, afetando a sobrevivência de peixes e outros organismos aquáticos. Nutrientes compõem o quarto grupo, e estes podem estimular o crescimento de algas ou outras plantas aquáticas, criando problemas como odores na água, diminuição de diversidade, ou mesmo contaminação tóxica em bivalves marinhos. E o quinto grupo apresenta aproximadamente 200 substâncias químicas identificadas (produtos farmacêuticos, metais, amônia, pesticidas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dentre outros), que podem causar toxicidade aguda e crônica em organismos aquáticos. As substâncias do quinto grupo podem ser encontradas em altas concentrações em esgoto não tratado, ou água de chuva, mas baixas concentrações também podem ser observadas no esgoto tratado.

Desafios, tais como, a composição do esgoto e a variação entre os tipos de tratamento, levantam questões sobre os efeitos biológicos causados pelo esgoto tratado e não tratado no ecossistema aquático. Por isso, é importante e necessário identificar biomarcadores e indicadores biológicos que possam fornecer informações úteis sobre os efeitos adversos no organismo até níveis de maior complexidade ecológica (populações e comunidades).

Por estas razões, este estudo foi dividido em duas etapas. A primeira delas (Capítulo I) teve como objetivo contribuir com mais informações sobre os efeitos tóxicos do esgoto doméstico não tratado sob condições controladas em laboratório utilizando biomarcadores imunológicos, histopatológicos, bioquímicos e ecológicos. Já a segunda etapa consistiu em um estudo de campo, utilizando os mesmos biomarcadores estudados na primeira fase. Os resultados da primeira fase foram utilizados como uma base de informação sobre os potenciais efeitos tóxicos causados pelo esgoto não tratado.

A maior parte do presente estudo foi realizada no Canadá, através do convênio entre o grupo do laboratório de Toxicologia Celular (Departamento de Biologia Celular – UFPR) sob coordenação do Prof. Dr. Ciro A. de Oliveira Ribeiro e o grupo do laboratório de Ecologia e Toxicologia Ambiental (*National Water Research Institute of Canada – Burlington* (ON) e *Environment Canada* (NB)) sob a coordenação da Dra Sylvie St-Jean, o qual proporcionou treinamento numa área de grande importância para os estudos ambientais no Brasil aplicáveis também em outros países.

OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivos gerais:

Avaliar os efeitos do esgoto doméstico tratado e não tratado no mexilhão azul (*Mytilus edulis*), utilizando biomarcadores de contaminação ambiental.

Padronizar alguns biomarcadores para avaliação dos efeitos tóxicos no sistema imune do bivalve marinho *Mytilus edulis* após exposição ao esgoto bruto através de bioensaio;

Aplicar os biomarcadores utilizados no bioensaio para avaliar os efeitos tóxicos do esgoto doméstico tratado e não tratado no sistema imune de *M. edulis* exposto a efluentes *in situ*;

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar os efeitos tóxicos do esgoto tratado e não tratado no sistema imune de *Mytilus edulis* através da medida da atividade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e resistência a patógenos, tanto em laboratório como *in situ*.

Avaliar os efeitos tóxicos do esgoto tratado e não tratado em brânquias e glândula digestiva de *M. edulis*, através de análises de microscopia de luz e eletrônica de varredura.

Capítulo I

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ESGOTO DOMÉSTICO NÃO TRATADO EM *Mytilus edulis* ATRAVÉS DE BIOENSAIOS

Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná

Orientação:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Departamento de Biologia Celular/UFPR

Co-orientação:

Dra. Sylvie St-Jean
Environment Canada (atualmente trabalhando para Jacques Whitford Ltda.)

1. INTRODUÇÃO

O esgoto não tratado é uma fonte comum de poluição para o ambiente aquático, e estudos demonstram que este tipo de despejo urbano é uma mistura de agentes químicos e biológicos que interagem entre si.

O desafio em desenvolver estudos para detectar a toxicidade do esgoto depende especialmente da complexa composição do esgoto, a qual depende das atividades desenvolvidas pelas comunidades. Metais (GAGNON et al., 2006), produtos farmacêuticos e de uso pessoal (BOYD et al., 2003; MIAO et al., 2004; JJEMBA, 2006), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (HOEGER et al., 2004; ALONSO et al., 2005), PCBs (policloro bifenilas), pesticidas (MANTIS et al., 2005; ENVIRONMENT CANADA, 2001), além de compostos derivados do nitrogênio e fósforo são os principais grupos de substâncias químicas já detectadas em esgoto bruto e tratado. A interação entre esses compostos químicos entre si e com fatores ambientais (temperatura, salinidade, sedimento) cria incontáveis combinações de substâncias e reações, as quais podem provocar efeitos para a biota aquática. Uma segunda razão que torna o estudo dos efeitos tóxicos do esgoto um desafio é a variação dos sistemas de tratamento de esgoto e as características do ambiente receptor. O tamanho da estação de tratamento, o volume e a qualidade do efluente produzido pela estação podem influenciar fortemente a toxicidade do esgoto em organismos aquáticos, assim como o clima, as estações do ano e o quanto do efluente o ambiente receptor pode assimilar (ENVIRONMENT CANADA, 2001).

A detecção de substâncias químicas presentes no esgoto levantou questões sobre os efeitos tóxicos das mesmas no ambiente aquático. Assim, vários estudos voltaram-se para a toxicidade das substâncias presentes no esgoto, mas a grande maioria deles foram realizados em laboratório, testando as substâncias isoladamente (PETROVIC et al., 2001; SOLÉ et al., 2001; DAILIANIS et al., 2003; MARIGÓMEZ et al., 2003; MARTTINEN et al., 2003). Apenas nos últimos anos é que alguns estudos foram realizados em laboratório expondo organismos ao esgoto tratado e não tratado (GAGNÉ et al., 2002; HOEGER et al., 2004; DINIZ et al., 2005).

Esta primeira parte deste estudo pretende colaborar com mais dados sobre os efeitos tóxicos do esgoto doméstico bruto (não tratado) na espécie *Mytilus edulis*, sob condições controladas, visando também, criar uma base de dados sobre os efeitos tóxicos causados apenas pelo esgoto no sistema imune deste bivalves, sem a interferência de outros fatores ambientais ou outros poluentes. Essa base de dados pretende facilitar a interpretação de resultados dos efeitos tóxicos do esgoto provenientes de estudos em campo, onde existe um grande número de variáveis a serem consideradas.

A espécie marinha *Mytilus edulis* além da sua importância econômica e biológica apresenta importantes características para este estudo, dentre elas: a habilidade de acumular vários xenobióticos, ampla distribuição geográfica na costa Atlântica Canadense e sua capacidade filtradora o que promove uma resposta integrada entre o tempo e os contaminantes presentes no ambiente. Uma outra característica interessante para estudos em toxicologia é que algumas espécies de bivalves são sésseis, passando quase toda sua vida fixada a um substrato, tornando possível detectar os efeitos tóxicos causados por poluentes de uma área restrita (NICHOLSON, 1999). Vários estudos toxicológicos têm considerado *Mytilus edulis* um modelo biológico eficiente (COLES et al., 1994; SAUVÉ et al., 2002; ST-JEAN et al., 2002 (a) e (b); ST-JEAN et al., 2003).

É possível avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes em diferentes níveis de organização biológica. Neste estudo, os potenciais efeitos tóxicos causados pelo esgoto na espécie *M. edulis* foram avaliados através de atividades biológicas ao nível celular, bioquímico, e imunológico.

Estudos demonstraram que os bivalves em geral são sensíveis a contaminantes, apresentando o sistema imune como um rápido agente de alerta ao estresse (ANDERSON, 1990; PIPE et al., 1995; DYRYNDA et al., 1997; SAUVÉ et al., 2002; ST-JEAN et al., 2002 (a) e (b); ST-JEAN et al., 2003). O sistema circulatório dos bivalves é considerado aberto, onde hemócitos circulam e representam o principal componente do sistema imune. *M. edulis* possui apenas o sistema imune inato e de acordo com PIPE (1992) e LÓPEZ et al. (1997), fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio

(O_2^- , H_2O_2 , NO , OH^-) são as principais funções executadas pelos hemócitos. No sistema imune inato, moléculas associadas aos patógenos são reconhecidas pelas células imunes dos organismos. No caso dos bivalves as células imunes são os hemócitos, e estes iniciam o processo de fagocitose e também a ativação da produção das espécies reativas de oxigênio, com a conseqüente destruição do patógeno ou molécula (ALBERTS et al., 2002).

A resposta de células fagocitárias na presença de contaminantes tem sido muito utilizada em estudos de toxicologia como uma ferramenta eficiente para medir as respostas imunológicas. As reações envolvidas no processo fagocitário ativam a NADPH oxidase, fazendo com que ocorra uma explosão respiratória, produzindo metabólitos citotóxicos tais como o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PIPE, 1992). A presença e a concentração desses radicais na célula demonstram como e quanto às células e os tecidos estão respondendo à presença do esgoto ou outros xenobiontes. Esses radicais, se não forem eliminados no interior das células, podem trazer conseqüências como: alteração no balanço redox, inativação de enzimas, degradação de proteínas, peroxidação de lipídios, danos no DNA e até morte celular (LIVINGSTONE et al., 1990). Para evitar um acúmulo e a toxicidade desses radicais, as células possuem um sistema de defesa enzimático e não-enzimático e ambos minimizam a toxicidade desses radicais, mantendo assim a homeostase celular. Entre os mecanismos de defesa enzimáticos podemos citar a atividade antioxidantes da catalase. Esta enzima é responsável pela degradação de moléculas de peróxido de hidrogênio e sua atividade é muito importante para proteção contra o estresse químico. Alguns contaminantes inibem a atividade enzimática da catalase, aumentando drasticamente a concentração de peróxido de hidrogênio (GERACITANO et al., 2002). Estudar a atividade dessa enzima foi um complemento ao estudo das respostas imunológicas neste trabalho e também uma ajuda à interpretação da produção de (EROs). Além desses mecanismos já citados as células também podem ativar a produção de compostos bactericidas, como é o caso do óxido nítrico. O óxido nítrico é uma molécula instável num sistema biológico, mas é possível medir a sua concentração nas células através de seus subprodutos, nitrito e

nitrito, provenientes de reações de redução. O óxido nítrico é produzido e reage com um radical superóxido formando peróxidonitrito. Essa molécula é um potente agente contra bactéria invasoras de tecidos e órgãos (WINK e MITCHELL, 1998).

As respostas imunológicas podem ser utilizadas como eficientes indicadores da ação tóxica de poluentes em células e organismos, mas nem sempre é possível obter resultados claros que revelem o quão saudável ou quão resistente à infecção o animal se apresenta. Por isso, existe uma demanda em estabelecer a que extensão a imunomodulação causada por poluentes poderia afetar a defesa e a habilidade de evitar infecções nos organismos. A forma encontrada para interligar as respostas imunológicas ao nível celular com a habilidade de defesa dos organismos contra agentes patogênicos presentes no ambiente, foi analisar as respostas celulares do sistema imune e ao mesmo tempo testar a habilidade desses animais eliminarem bactéria patogênica após serem expostos ao esgoto não tratado. Desta maneira, foi possível observar as respostas imunes em nível microscópico e macroscópico.

Entre os efeitos tóxicos causados pelo esgoto, já observados em espécies aquáticas (peixe e bivalve de água doce) estão: o aumento das metalotioneínas e da atividade das oxidases de função mista, os danos ao DNA, a indução de vitelogenina, a proliferação de linfócitos e a diminuição da atividade fagocítica (GAGNÉ et al., 2002; HOEGGER et al., 2004; DINIZ et al., 2005). Sabe-se que o sistema imune de bivalves pode ser modulado por vários contaminantes, mas pouco se sabe sobre a imunomodulação causada pelo esgoto. GAGNÉ et al. (2002) observaram que mexilhões de água doce (*Elliptio complanata*) expostos ao efluente do esgoto municipal na região de Montreal (Canadá) apresentaram um aumento da atividade fagocítica e no número de bactérias circulantes na hemolinfa. Enquanto que PIPE e COLES (1995) observaram uma diferença significativa no número de hemócitos, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio em *Mytilus galloprovincialis* após exposição a hidrocarbonetos clorinados e metais. Além disso, vários estudos já demonstraram que a modulação de alguns processos imunológicos pode estar associada com um aumento da susceptibilidade a doenças (PIPE e COLES, 1995; DYRYNDA et al., 1997; ST-JEAN et al., 2002 (a) e (b); ST-JEAN et al., 2003).

A histopatologia é uma ferramenta muito útil em estudos de toxicologia e pode ser facilmente relacionada com os biomarcadores imunológicos e bioquímicos, acima citados. As lesões detectadas em células, tecidos ou órgãos representam uma integração dos efeitos cumulativos dos agentes tóxicos em nível bioquímico e potencialmente a níveis mais altos da organização biológica (MYERS e FOURNIE, 2002).

O estudo histopatológico em glândula digestiva e brânquias de bivalves têm mostrado ser uma análise muito sensível quando se trata da ação de poluentes (SYASINA et al., 1997; WEDDERBURN et al., 1999; REBELO et al., 2000). As brânquias e a glândula digestiva de mexilhões constituem os maiores órgãos de acumulação de contaminantes, principalmente metais (DIMIATRIS et al., 2003). A brânquia é interessante para este estudo por ser o primeiro órgão em contato com a água contaminada, além de ser extremamente importante para funções como a filtração, a troca gasosa, a osmorregulação e a excreção. A glândula digestiva é responsável pela digestão de todas as partículas ingeridas e filtradas pelas brânquias. Alterações patológicas nestes dois órgãos podem estar refletindo distúrbios moleculares e bioquímicos. Já a identificação e a caracterização dos mesmos podem ajudar no entendimento das consequências para o organismo como um todo.

Determinar e caracterizar os efeitos tóxicos causados pelo esgoto na biota aquática é hoje um grande desafio. Este estudo não pretende de forma alguma vencer este desafio, mas visa contribuir com mais informações sobre a ação tóxica do esgoto em bivalves estuarinos sem a interferência de outras variáveis, objetivando principalmente a produção de dados e a discussão de métodos que possam ser utilizados em estudos futuros, auxiliando a interpretação de resultados obtidos em estudos de campo.

2. OBJETIVOS

- Estudar os efeitos tóxicos do esgoto doméstico bruto (ou não tratado) no sistema imunológico e em tecidos do mexilhão *Mytilus edulis* sob condições controladas.

- Através de bioensaios, estudar os efeitos tóxicos de diferentes concentrações e tempos de exposição do esgoto doméstico bruto no mexilhão (*Mytilus edulis*), analisando biomarcadores imunológicos e bioquímicos (atividade fagocítica, e produção de espécies reativas de oxigênio e atividade da catalase).

- Estudar variações morfológicas de brânquias e glândulas digestivas (microscopia de luz, eletrônica de varredura) de *Mytilus edulis* expostos a diferentes concentrações e tempo de exposição do esgoto doméstico bruto.

- Verificar se os potenciais efeitos tóxicos do esgoto bruto no sistema imunológico dos mexilhões estariam afetando a capacidade de defesa desses animais, através de um desafio bacteriológico.

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. Padronização de metodologias e experimento

3.1.1. Padronização da expressão dos resultados dos testes imunológicos

Durante o primeiro ano de estudo (2004), algumas das metodologias foram padronizadas, assim como o desenvolvimento do bioensaio.

A medida da atividade fagocítica, a produção de peróxido de hidrogênio, a contagem de hemócitos e a viabilidade celular vêm sendo utilizadas em diversos estudos, mas cada autor expressa os resultados de forma diferente. Como um dos objetivos deste estudo é poder utilizar essas metodologias para ajudar na interpretação de resultados de estudo em campo, foi necessário criar uma padronização na expressão dos resultados, a qual poderia ser utilizada em estudos de laboratório e/ou campo. Por exemplo, a atividade fagocítica é geralmente expressa como mg de zimosan por mg de proteína total. Mas, muitas vezes quando coleta-se a hemolinfa dos animais, pode-se coletar células reprodutivas (gametas femininos e masculinos) ou mesmo outros tecidos e conseqüentemente obtém-se uma maior quantidade de proteína, que na realidade não representa a quantidade de proteína total apenas dos hemócitos. A forma encontrada para expressar os resultados foi relacionar as medidas (fagocitose, produção de compostos citotóxicos) com o número de hemócitos presentes nas amostras de hemolinfa. Assim, todos os resultados representam a medida da atividade ou produção de compostos em um milhão de hemócitos. Aqui vale ressaltar que não foi realizada uma contagem de hemócitos diferenciada, mas sim uma contagem do total de células granulares e agranulares.

3.1.2. Padronização da medida da produção do óxido nítrico

A metodologia para medir produção de óxido nítrico foi padronizada para a espécie *M. edulis* neste estudo, e esta começou a ser utilizada como um biomarcador recentemente. Neste estudo, a metodologia foi baseada em TAFALLA et al. (2002) com algumas modificações.

O maior desafio foi estabelecer qual substância ou molécula estimularia a produção do óxido nítrico nos hemócitos e em quais concentrações. Vários estudos já demonstraram que os hemócitos de mexilhões podem ser estimulados a produzir

espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2) quando expostos a materiais particulados ou solúveis não próprios dos hemócitos, incluindo forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias (LPS), laminarina ou zimosan (*Saccharomyces cerevisiae*) (PIPE, 1992; KUMAZAWA et al., 1993; NOËL et al., 1993; MORTENSEN e GLETTE, 1996; WINSTON et al., 1996; ARUMUGAN et al., 2000). A partir dessa informação e algumas outras publicações, iniciou-se uma série de testes utilizando forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS) e zimosan. As seguintes concentrações e tempo de incubação foram testados:

PMA (100 μ g/ml)

PMA (10 μ g/ml)

Zimosan (50 μ g/ml)

Zimosan (2000 μ g/ml)

LPS (1, 2 e 5U)

Todas essas concentrações foram testadas durante ½, 1, 2 e 4 horas de incubação.

Após vários testes concluiu-se que zimosan (2000 μ g/ml) foi o que apresentou uma melhor resposta, estimulando a produção de óxido nítrico. E o melhor tempo de incubação foi de 2 horas.

As outras padronizações nesta metodologia foram referentes ao volume de reagentes, já que tudo foi realizado em microplacas de 96 poços.

3.1.3. Padronização da medida da atividade da catalase

A metodologia utilizada para medir a atividade da catalase seguiu COHEN et al. (1996).

A única adaptação nesta metodologia foi quanto ao volume e proporções dos reagentes utilizados, uma vez que foram utilizadas microplacas de 96 poços ao invés de cubetas.

3.1.4. Padronização do desenho experimental - bioensaio

O desenho experimental foi testado 5 vezes. Durante as primeiras tentativas, foram realizados experimentos estáticos, os quais não foram bem sucedidos. Devido à composição do esgoto não foi possível manter os animais vivos expostos à mesma

água por mais de 7 dias. Durante essa exposição houve uma elevada produção de amônia resultando em 100% de mortalidade dos animais. Foi decidido, então, que o experimento teria que ser semi-estático, já que seria impossível realizar um experimento com fluxo contínuo, devido ao alto volume de água salgada necessário. Por outro lado, criando um experimento semi-estático, não seria viável realizar as trocas de água dos aquários manualmente, então o próximo desafio foi criar um desenho experimental utilizando bombas d'água. Após o aceite da estação de tratamento de esgoto em colaborar com o estudo, foi decidido que o experimento seria realizado na estação num laboratório móvel, onde um sistema de bombas esvaziaria e encheria os aquários, mas o preparo das novas soluções de esgoto, assim como a adição do sal marinho artificial seria realizado manualmente.

Até o final de 2004, todas as metodologias e o aparato experimental estavam definidos.

3.2. Central de Tratamento de Esgoto

O experimento foi realizado na central de tratamento de esgoto denominada ERPAS (*East River Pollution Abatement System*) localizada na cidade de *Trenton*, Distrito de *Pictou*, *Nova Scotia*, Canadá (Figura 1). Essa central de tratamento serve aproximadamente 25.000 residências das cidades de *Stellarton*, *New Glasgow* e *Trenton*, além de outras pequenas comunidades que fazem parte do Distrito de *Pictou* e recebe uma média de 17 milhões de litros de esgoto não tratado por dia. O tipo de tratamento de esgoto em ERPAS é secundário, aonde resumidamente, o esgoto que chega das residências passa por câmaras contendo telas (filtros) que retêm as partículas sólidas. Após esta etapa, o esgoto passa para tanques de aeração, onde microrganismos (rotíferos e outros) recebem condições adequadas (oxigênio basicamente) para crescerem e se alimentarem do esgoto, degradando assim os compostos orgânicos. No passo seguinte, o esgoto é novamente decantado e em seguida ocorre o processo de cloração (Cl_2 gás) e de cloração (SO_2 gás), e então esse efluente é despejado diretamente no rio Leste (*East River*). Esse rio sofre influência de marés e é considerado uma região estuarina, onde foi realizada a segunda parte deste

estudo. Para o bioensaio, foi utilizado o esgoto antes de passar pelo sistema de tratamento. As amostras do esgoto eram coletadas após passar pelo primeiro sistema de grades (telas), as quais separam as partículas sólidas, por isso o esgoto usado no experimento foi considerado não tratado ou bruto. A decisão de utilizar o esgoto não – tratado foi tomada por não haver estudos em laboratório testando a mistura de compostos presentes no esgoto não tratado.



Figura 1. Estação Central de Tratamento de Esgoto da cidade de *Treton*, Nova Scotia, Canadá. A-Vista aérea da estação. Observar os tanques de decantação (D) e de aeração (T). B-Vista detalhada dos tanques de decantação (TD). C-Vista detalhada do canal por onde passa o esgoto bruto, após passar pelo primeiro sistema de grades (EP). D-Vista detalhada dos tanques contendo microrganismos, aeração (TA).

3.3. Modelo Biológico

A espécie utilizada como modelo biológico neste estudo foi o mexilhão *Mytilus edulis* (Figura 2). Esta espécie é encontrada em águas temperadas dos hemisférios norte e sul. A temperatura média para o melhor crescimento da espécie está entre 16 a 22°C. Esse mexilhão pode ocorrer em baías e estuários onde uma alta quantidade de nutrientes é encontrada, o que causa um aumento de fitoplâncton (principal fonte de alimento para a espécie). Esses organismos preferem ambientes rasos, não ocorrendo em profundidades maiores que 10m. Alimentam-se através de filtração realizada pelos filamentos das brânquias, onde pequenas partículas de fitoplâncton e outros materiais são selecionados (AQUACULTURA AUSTRALIA, 2003). *M. edulis* é capaz de remover partículas de 2-3 µm com 80 - 100% de eficiência (MØHLENBERG e RIISGÅD, 1977). Esta espécie tem seu comprimento geralmente variando em média de 50 a 100 mm, dependendo das condições ambientais. (ALEXANDER, 1979).

Para este estudo, 1020 mexilhões adultos foram adquiridos numa fazenda de cultivo (maricultura) localizada no município de *Malagash, Nova Scotia*, onde a produção e qualidade dos animais são fiscalizadas por um órgão governamental. Devido aos estudos realizados nessas fazendas, sabe-se que esses mexilhões são saudáveis garantindo assim, a qualidade do experimento. Antes dos animais serem aclimatados, vinte deles foram amostrados e todos os parâmetros imunológicos foram medidos. Isto forneceu informações sobre o estado do sistema imune dos mexilhões no dia 0, antes de serem aclimatados e também foi uma confirmação do estado de saúde desses animais antes do experimento. O resultado desse dia 0 foi comparado com o resultado dos ensaios imunológicos dos mexilhões do grupo controle, possibilitando acessar os efeitos do aquário e manipulação dos animais durante o experimento.

Os animais foram aclimatados em aquários (15 l) contendo água salgada artificial (salinidade 18 ‰ (sal marinho artificial Kent ®), temperatura de 15°C ± 2) por 7 dias. Os mexilhões foram alimentados com um complexo fitoplanctônico (*Phytoplex Kent®*). A aeração foi controlada (400 ml/min) através do uso de fluxômetros. Os níveis de amônia total e não-ionizada foram medidas nos dias 0, 7, 14 e 21 e seguiram o método

padronizado utilizado pelo *Environment Canada*, através do uso de eletrodo e medida do pH.



Figura 2. Espécie estudada, *Mytilus edulis*, também conhecida como mexilhão azul.

3.4. Desenho Experimental

O experimento foi realizado num laboratório móvel (Figura 3), o qual foi deslocado até a central de tratamento de esgoto. Uma estrutura com vinte e cinco aquários (capacidade de 15l cada) foi montada neste laboratório e fatores abióticos (salinidade, temperatura, aeração e fotoperíodo) foram controlados. Este experimento foi considerado semi-estático, onde ocorreram duas trocas do volume total de água dos aquários duas vezes por dia (a cada 12 horas). As concentrações testadas foram 12,5%, 25%, 50% e 100%, além do grupo controle (0%) (Figura 4A). Cada tratamento teve 5 réplicas (aquários) contendo 40 mexilhões em cada réplica (Figura 4B). O experimento teve uma duração de 21 dias. Para obter as concentrações testadas foram utilizados tanques (100 l) onde o esgoto não tratado e a água doce filtrada eram bombeados, e manualmente o sal marinho artificial era adicionado à mistura, e dissolvido.

Após preparação das concentrações, salinidade era medida e as soluções eram então bombeadas para os aquários. Em cada um dos tanques (100 l) havia uma bomba distribuindo as misturas em seus respectivos aquários. Para esvaziar os aquários, foi utilizada uma outra bomba que sugava todo o volume de água e esgoto dos aquários,

despejando essa mistura no canal do tratamento de esgoto (Figura 5). A água doce foi filtrada (retirada de amônia e cloro) antes de ser utilizada para o preparo das concentrações. As concentrações eram preparadas minutos antes de serem bombeadas para os aquários, garantindo assim, amostras frescas de esgoto. A salinidade foi mantida em torno de 18 a 20‰ e a aeração a 400 ml/min de ar (uso de fluxômetro). Os aquários foram todos mantidos cobertos com tampas de acrílico para evitar a evaporação de CO₂, consequentemente evitando a elevação do pH e da concentração de amônia. O fotoperíodo foi controlado (13 horas claro: 11 horas escuro).

Amostras de água foram coletadas no dia 7, 14 e 21 para medir a concentração de amônia na água. Todos os dias durante 21 dias, os aquários foram esvaziados, novas misturas foram preparadas e os aquários eram preenchidos novamente (Figura 5). Esta rotina ocorreu duas vezes ao dia (às 7 horas da manhã e às 7 horas da noite) durante todo o período de exposição. Após 7º, 14º, e 21º dia de exposição foram amostrados 5 animais de cada aquário (4 aquários = 20 animais por tratamento). Dez desses animais tiveram sua hemolinfa amostrada para as medidas de atividade fagocítica, produção de peróxido de hidrogênio, viabilidade celular e contagem de hemócitos, além da coleta das glândulas digestivas para medir a atividade da catalase. Os outros 10 mexilhões também tiveram sua hemolinfa amostrada para a medida da produção de óxido nítrico e brânquias e glândula digestiva para microscopia de luz e eletrônica de varredura. No 21º dia, 10 animais do quinto aquário (de cada concentração) foram amostrados e submetidos ao desafio bacteriológico (descrição do método segue abaixo).

Os mexilhões amostrados foram mantidos em gelo durante a coleta da hemolinfa e dos órgãos. As brânquias do lado direito do animal e a glândula digestiva foram fixadas em ALFAC para microscopia de luz, as brânquias do lado esquerdo foram fixadas e preparadas para microscopia eletrônica de varredura. As glândulas digestivas para medida da atividade da catalase foram congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C até processamento.



Figura 3. A – Laboratório móvel usado para o experimento. B – Laboratório móvel estacionado ao lado do canal por onde passa o esgoto não tratado.

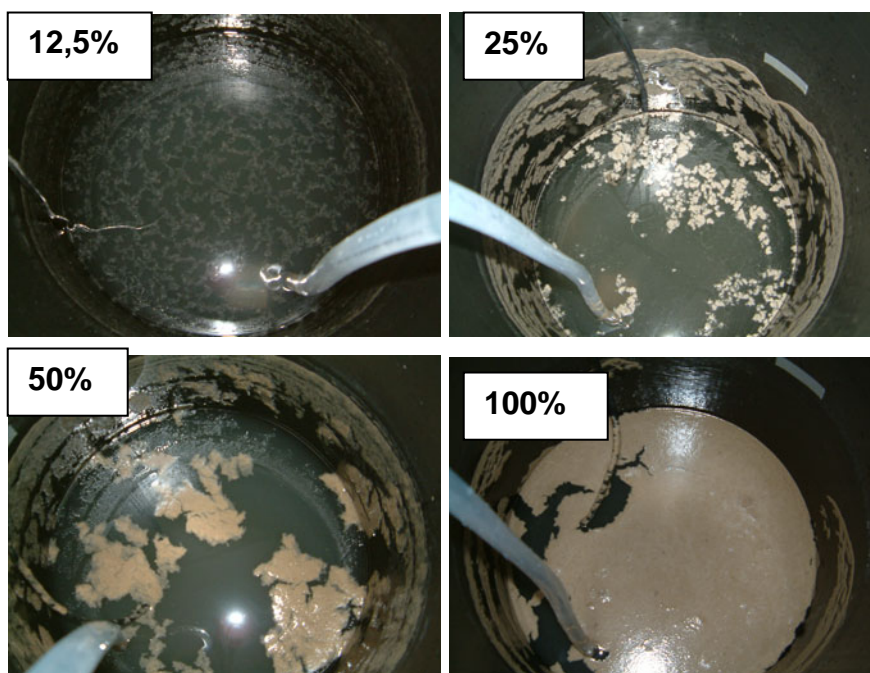


Figura 4 a. Ilustração dos tanques (100l) contendo as 4 concentrações de esgoto não tratado testados neste estudo.



Figura 4 b. Ilustração dos tanques (100l) onde as concentrações de esgoto eram preparadas e os aquários (5 réplicas) por tratamento.



Figura 5. Trocas de água dos aquários a cada 12 h. A-Mistura do esgoto, água filtrada e sal. B-Instrumento utilizado para misturar e diluir o sal marinho. C-Sistema de tubos utilizado para a retirada da água dos aquários através de bombeamento. D-Sistema de tubos criado para encher os aquários com as novas soluções.

3.5. Extração da Hemolinfa

Amostras de hemolinfa foram obtidas por punção do seio hemolinfático do músculo adutor dos mexilhões, de acordo com o protocolo desenvolvido por ST-JEAN et al. (2003). Cada 500 µl de hemolinfa foi diluído 1:1 com tampão trizma (TBS), pH 8,4, 930 mOsm. A solução hemolinfa/TBS foi então transferida para a microplaca de 96 poços, possibilitando uma triplicata para cada ensaio (3x100 µl para atividade fagocítica e produção de peróxido de hidrogênio), 100 µl para contagem de hemócito e 20 µl para viabilidade celular e também 6 X 100 µl para produção de óxido nítrico. Os animais coletados foram divididos, sendo um grupo utilizado apenas para a medida da produção do óxido nítrico e um outro utilizado para medir o restante dos ensaios.

3.6. Ensaios Imunológicos, Bioquímicos e Morfológicos

3.6.1. Atividade Fagocítica

Os hemócitos presentes na hemolinfa de mexilhões são capazes de realizar fagocitose de partículas estranhas ao organismo consistindo um dos principais mecanismos de defesa nestes animais. A metodologia utilizada neste estudo segue ST-JEAN et al. (2003) com algumas modificações (Anexo 1). Basicamente, o método utilizado mede a capacidade dos hemócitos fagocitarem partículas do fungo *Saccharomyces cerevisiae* (zimosan) associados ao corante vermelho neutro. Os hemócitos foram incubados com essas partículas por 30 min. Após esse intervalo de tempo, as células foram lavadas (adição de 100µl de TBS por poço, centrifugação (5min 2500 xg) e retirada do TBS das placas) e apenas o que foi absorvido pelas células permaneceu. Então essas células foram solubilizadas (solução de extração) e as partículas coradas foram expelidas e a leitura foi feita através de espectrofotômetro (540 nm), o qual possibilitou observar as diferenças de intensidade de cor entre as amostras. A quantificação das partículas coradas absorvidas pelos hemócitos foi realizada através do uso de uma curva padrão de zimosan corado. A atividade fagocítica pode ser induzida ou inibida por xenobiontes e essa relação depende muito da concentração de xenobiontes a que os organismos estão sendo expostos. O

resultado foi expresso como miligramas de zimosan absorvidos por um milhão de células.

3.6.2. Medida da Produção do Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

O processo de fagocitose ativa uma série de reações que ocorrem nas células conhecidas como explosões respiratórias, as quais produzem espécies reativas de oxigênio, tais como: O_2^- , H_2O_2 e OH^- . O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é formado a partir de uma molécula de superóxido (O_2^-). Essa reação é catalisada pela enzima antioxidante superóxido dismutase e também por outros mecanismos celulares. A produção de peróxido de hidrogênio pode ser medida através de uma reação entre o corante vermelha fenol e peróxido na presença de peroxidase. A reação de oxidação do vermelho fenol, dependente da peroxidase, produz uma diferença em coloração que pode ser detectada pelo espectrofotômetro (620 nm). O método utilizado para medir a produção de H_2O_2 é descrito por PIPE (1992) com algumas modificações (Anexo 2). O resultado foi expresso como densidade óptica por um milhão de células.

3.6.3. Viabilidade Celular e Contagem de Hemócitos

A viabilidade celular expressa a porcentagem de células vivas em relação ao total de células (vivas e mortas) (Anexo 3).

Contagem de hemócitos é utilizada como um parâmetro, pois vários estudos demonstraram que um dos primeiros sinais de alteração do sistema imune de bivalves após exposição a poluentes é a variação no número de hemócitos circulando na hemolinfa, e esse número pode aumentar ou diminuir dependendo da concentração e tempo de exposição aos poluentes (Anexo 4). Os resultados foram expressos como % de células vivas (viabilidade celular) e número de células totais.

3.6.4. Medida da Produção de Óxido Nítrico

Óxido nítrico é uma importante molécula envolvida em diferentes processos celulares e é sintetizada por enzimas óxido nítrico sintase. Quando as células estão sendo invadidas por bactérias, a óxido nítrico sintase induzida é ativada e inicia a produção de óxido nítrico, o qual reage com um radical superóxido (O_2^-) e produz peróxidonitrito que age como bactericida. O óxido nítrico é uma molécula instável, e logo é reduzida a nitrito ou nitrato (WINK e MITCHELL, 1998). Para medir a produção

do mesmo é utilizado uma técnica onde os compostos sulfanilamida e N- (1- naftil)-etilenediamina, na presença de nitrito reagem e o resultado é a formação de diazonium, o qual apresenta uma coloração rósea (Anexo 5). O resultado foi expresso como concentração de nitrito por milhão de células.

3.6.5. Microscopia de Luz

Três brânquias e três glândulas digestivas por réplica/tratamento (12 brânquias e 12 glândulas digestivas por tratamento por período de exposição) foram amostradas para microscopia de luz, foram fixadas em ALFAC, durante 16 horas e após foram mantidas em álcool 70% até processamento. Foi utilizado o protocolo padrão de microscopia de luz do Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR no processamento do material: desidratação, diafanização, infiltração em paraplast plus®, emblocagem, trimagem, corte em micrótomo com espessura de 5 µm, coloração hematoxilina e eosina e análises em microscópio de luz Zeiss Axiophot (Anexo 6). Os resultados foram expressos como a prevalência de mexilhões apresentando lesões e através do índice de lesão para cada órgão. A metodologia utilizada para avaliar o índice de lesão foi descrito por BERNET et al. (1999). Este índice é baseado na soma das lesões (*score ranking*) e no fator de importância para cada lesão encontrada no órgão. A soma das lesões neste estudo é representada pela porcentagem de lesões observadas em 30 filamentos das brânquias de cada animal e em 10 campos microscópicos (objetiva de 40X) analisados nas glândulas digestivas (0 = 0; 1 = 1% a 24%; 2 = 25% a 49%; 4 = 50% a 74%; 6 = 75% a 100% de lesões nas brânquias e glândula digestiva). Cada brânquia e glândula digestiva foi classificada dentro de 3 modelos de reação (mudanças regressivas, progressivas, inflamação), as quais incluem várias alterações nas unidades funcionais dos órgãos ou no órgão como um todo (BERNET et al., 1999). O fator de importância foi determinado para cada lesão dependendo de como a lesão afeta a função dos órgãos (mínimo (1); moderado (2) e irreversível (3)). Mais detalhes sobre essa metodologia pode ser encontrado em BERNET et al. (1999). A expressão utilizada para calcular o índice de lesão é a seguinte:

$$I_{\text{org}} = \sum_{\text{reação}} \sum_{\text{alteração}} (a_{\text{org reaç. alt.}} \times w_{\text{org reaç. alt.}})$$

a = score para porcentagem de lesão por órgão; w = fator de importância de cada lesão em cada órgão.

Durante a análise foi observada a presença de grânulos de lipofuscina no tecido branquial. Para confirmar que os grânulos observados eram de lipofuscina, as brânquias foram coradas com a técnica de Fontana Masson e uma contagem foi realizada utilizando um graticulo em microscópio de luz. O resultado foi expresso como uma média da contagem por indivíduo, sendo representado como número de grânulos de lipofuscina por mm^2 de tecido. O software *Image* (*Image Process Tool for Photoshop*) foi usado para medir o perímetro do sinus hemolinfático das brânquias e do lúmen dos túbulos digestivos.

3.6.6. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para esta análise foram amostradas 12 brânquias por tratamento e por período de exposição. As amostras foram fixadas em Glutaraldeído 3% em tampão Cacodilato 0,1M pH 7,4. As amostras permaneceram no fixador até processamento. Aqui também foi utilizado protocolo padrão do Laboratório de Toxicologia Celular/UFPR para microscopia eletrônica de varredura: desidratação, ponto crítico, metalização e análise em microscópio eletrônico de varredura (Jeol 5200) (Anexo 7). Esta técnica possibilitou avaliar os efeitos do esgoto bruto na superfície das brânquias de *M. edulis*, assim como alterações na estrutura dos cílios branquiais.

3.6.7. Medida da Atividade da Catalase

A enzima antioxidante catalase é responsável pela degradação de peróxido de hidrogênio, considerado uma molécula altamente citotóxica, resultado de uma explosão respiratória durante a atividade fagocítica (LIVINGSTONE et al., 1992). A glândula digestiva de mexilhões é um dos órgãos que apresenta a mais alta taxa de atividade enzimática para catalase (LIVINGSTONE et al., 1990), por isso este órgão está sendo utilizado para essa análise. A metodologia utilizada neste estudo foi desenvolvida por

COHEN et al. (1996) e resume-se na quantificação do consumo de peróxido de hidrogênio em cada amostra durante um intervalo de tempo de aproximadamente 10 minutos. Este método possibilita medir colorimetricamente a concentração de peróxido de hidrogênio que não é consumida pela catalase, utilizando uma solução de tiocianeto de potássio e sulfato ferroso. O peróxido de hidrogênio converte íons ferrosos em íons férricos e estes reagem com tiocianeto emitindo coloração que pode ser medida através de espectrofotômetro num pico que varia entre 450 a 480 nm (Anexo 8).

Os resultados são expressos em termo da taxa constante de primeira ordem de reação (k), calculado como a seguir:

$$\text{Uma unidade de catalase} = [\ln (A_1/A_2) / (t_1/t_2)] / \text{mg proteína}$$

Onde ln é o log natural, A_1 é a absorbância no tempo 1 (t_1) e subsequente períodos. Neste caso será analisado em dois tempos (1 e 9) e t será = 8 min.

3.7. Desafio Bacteriológico

Este teste foi realizado em mexilhões expostos ao esgoto por 21 dias, com o objetivo de verificar se o esgoto estaria alterando a resistência a doenças causadas por microrganismos na espécie em estudo. A bactéria utilizada para este teste foi a *Listonella* (= *Vibrio*) *anguillarum*. Esta bactéria já vem sendo empregada em laboratório para testes imunológicos com mexilhões (ST-JEAN et al., 2002 (b)). MCHENERY e BIRKBECK (1986) observaram que 8 espécies de *Vibrio* inibiam rapidamente a filtração de adultos *Mytilus edulis*, enquanto que outras bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas* foram rapidamente ingeridas e metabolizadas por *M. edulis*. Isto demonstra que *Mytilus edulis* é relativamente sensível a *Vibrio*. A cultura original de *L. anguillarum* foi obtida através do laboratório de microbiologia do Departamento de Pesca e Oceano (*Department of Fisheries and Oceans*) em *Moncton, New Brunswick*. O preparo dessa cultura de bactéria demorou aproximadamente 2 meses. A única forma de selecionar essas bactérias e identificá-las durante o teste com *M. edulis* foi torná-las resistentes a dois antibióticos (estreptomicina e rifampicina), desta forma apenas essas bactérias resistentes aos antibióticos cresceriam no meio de cultivo com os antibióticos,

evitando contaminação por outras bactérias. Foi necessário um determinado tempo para tornar as bactérias resistentes aos antibióticos. As bactérias foram mantidas em meio sólido TSA - 2% NaCl (*Tryptcase-soya-agar*) pH 7,3 (Anexo 9) e colônias foram transferidas para novas placas até a obtenção de um grande número de bactérias. A resistência aos antibióticos ocorreu gradualmente, onde as colônias inicialmente foram transferidas para meios contendo baixa concentração de estreptomicina (100 mg/l). Essas bactérias foram mantidas em meio contendo 100 mg/l de estreptomicina até que houvesse mutações e estas se tornassem resistentes ao antibiótico. Essa adaptação foi observada quando a colônia começou a crescer da mesma maneira que cresceu quando estava em um meio sem antibiótico. Essa concentração de antibiótico foi aumentada para 250 mg/l e posteriormente para 500 mg/l. Quando as bactérias tornaram-se resistentes a mais alta concentração de estreptomicina, começou o mesmo processo utilizando rifampicina. A resistência aos antibióticos ocorreu gradualmente, através do uso inicialmente de 20 mg/l, 60 mg/l e 100 mg/l de rifampicina. Quando as bactérias tornaram-se resistentes aos dois antibióticos às culturas foram replicadas em meio contendo estreptomicina 500 mg/l e rifampicina 100 mg/l até a utilização no experimento (Figura 6). Vinte quatro horas antes de iniciar o teste bacteriológico, as bactérias foram transferidas para o meio líquido (Broth Marinho) sem antibióticos. O mesmo tipo de meio foi preparado com antibióticos e 200 µl foram adicionados em cada poço de microplaca (96 poços) que foi utilizado para a quantificação do número de bactérias eliminadas pelos animais após 24 horas de infecção.

Para quantificar o número de bactérias antes e após infecção foi utilizado o método do número mais provável. Esta técnica consiste na preparação de uma diluição decimal em série de um volume conhecido da solução de bactéria (20 µl) em uma microplaca de 96 poços estéreis. Os poços foram examinados visualmente até a menor concentração de bactéria (ou seja, 1 bactéria), onde foi possível contar o número de bactérias e também foi realizada a leitura em espectrofotômetro (620 nm). Desta forma foi possível estabelecer uma curva padrão e esta foi utilizada para a contagem.

Após 21 dias de exposição ao esgoto, dez animais por tratamento foram infectados com 200 µl da suspensão de *Listonella anguillarum* (concentração de 10^{17}

bactérias em 200µl). O meio de cultivo foi injetado no músculo adutor posterior dos mexilhões e estes foram mantidos por 2 horas fora d'água, fornecendo tempo necessário para que as bactérias se estabelecessem no bivalve infectado, após esse intervalo os animais retornaram para aquários contendo apenas água salgada. Após 24 horas de incubação, 200 µl de hemolinfa foram coletadas. Este volume foi dividido em 100 µl por poço (réplicas) em microplacas já contendo 200 µl de meio líquido com antibióticos (Broth marinho com 500 mg/l de estreptomicina e 100 mg/l rifampicina) (Anexo 9). Após a adição da hemolinfa nas placas, foi realizada a diluição em série e as bactérias foram mantidas a temperatura ambiente por 24 horas (crescimento) seguido da leitura com espectrofotômetro (620 nm). O resultado foi expresso como a média do número de bactérias em 200 µl de hemolinfa de 10 mexilhões por tratamento.

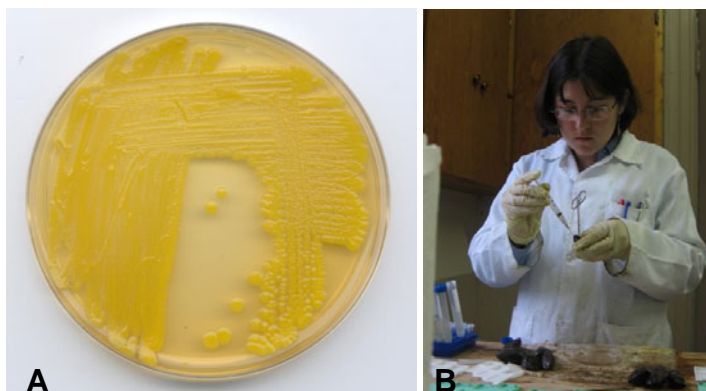


Figura 6. A- Placa contendo a cultura de bactéria (*Listonella anguillarum*). B – Injetando a cultura de bactéria nos mexilhões.

3.8. Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SYSTAT (SPSS Inc. Chicago). A distribuição das variáveis foi testada para homogeneidade e normalidade usando os plots de probabilidade. Os desvios foram corrigidos usando a função log-transformadora. As diferenças entre as réplicas foram testadas pela ANOVA, seguida do teste posteriori de *Tukey*. Como não houve diferenças estatísticas entre elas, as mesmas foram agrupadas. As diferenças entre os tratamentos e o grupo controle para todos os ensaios imunológicos (fagocitose, produção de H_2O_2 e óxido nítrico, contagem de hemócitos, viabilidade celular e atividade da catalase), assim como o número de

grânulos de lipofuscina, índice de lesão e desafio bacteriológico foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste *Tukey*. Para estas análises, tempo (7, 14 e 21 dias) e concentração (0%, 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado) foram considerados como as variáveis independentes. As diferenças significativas foram reportadas quando $P < 0,05$. Cada variável das análises histopatológicas (prevalência de mexilhões apresentando lesão) foi comparada com o teste não-paramétrico Kruskal- Wallis, devido à natureza dos dados de histopatologia (levantamento visual relacionados em categorias ao invés de dados de medidas contínuas). As análises não-paramétricas foram seguidas do teste de múltipla comparação não-paramétrico (*one- tailed*), o qual testou o rank das médias de prevalência de cada tratamento (12,5%, 25%, 50% e 100%) contra o grupo controle (0%) independentemente (ZAR, 1996).

4. RESULTADOS

Os animais expostos a 50% e 100% de esgoto não tratado apresentaram uma mortalidade de 45% e 58%, respectivamente, enquanto que não foi observada mortalidade no grupo controle e nos grupos expostos a 12,5% e 25% de esgoto não tratado.

A média das medidas de amônia total e não-ionizada para cada tratamento (controle, 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado) nos 3 períodos de exposição (7, 14 e 21 dias) são apresentadas na tabela 1.

TABELA 1- MÉDIA DA MEDIDA DA CONCENTRAÇÃO DE AMÔNIA TOTAL E NÃO-IONIZADA EM AMOSTRAS DE ESGOTO NÃO TRATADO COLETADAS NO 7^o, 14^o E 21^o DIA DE EXPOSIÇÃO.

Tratamentos	Controle	12,5%	25%	50%	100%
Amônia Total (mg/l)	0,624	1,21	2,75	8,67	13,45
Amônia não-ionizada (mg/l)	< 0,01	< 0,01	0,01	0,01	0,02

Os resultados dos ensaios imunológicos realizados no dia 0, antes do período de aclimação foram comparados com os resultados provenientes do grupo controle amostrado nos dias 7, 14 e 21. A comparação demonstrou que não houve nenhuma diferença significativa entre os dois resultados, demonstrando que não houve um estresse imunológico devido ao manuseio dos animais durante o período de estudo.

As análises dos ensaios imunológicos demonstraram que os mexilhões expostos a 50% de esgoto não tratado apresentaram uma atividade fagocítica mais elevada quando comparado com mexilhões do grupo controle ($P < 0,05$; $F = 2,472$) após 14 dias de exposição (Figura 7), mas nenhuma diferença significativa foi observada na atividade fagocítica dos mexilhões testados após 7 e 21 dias de exposição à mesma concentração. Além dessa elevação da atividade fagocítica nos mexilhões expostos a 50% de esgoto não tratado no 14^o dia, nenhuma outra diferença estatisticamente significativa foi observada nos demais grupos e tempo de exposição. Apesar de ser

possível observar uma tendência da atividade fagocítica elevar-se durante os primeiros dias de exposição, especialmente nas concentrações mais altas (Figura 7), essa tendência não foi estatisticamente significativa.

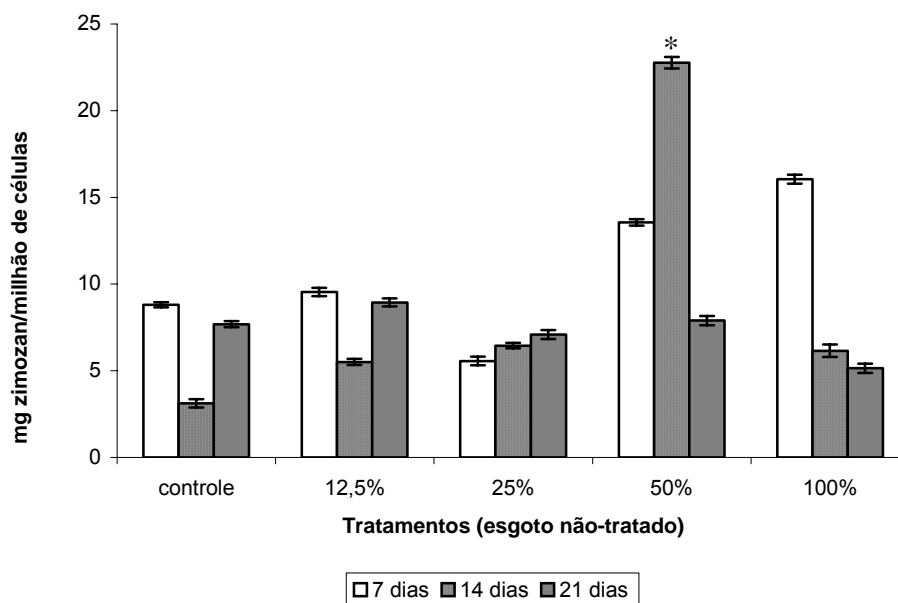


Figura 7. Atividade fagocítica em hemócitos de mexilhões (*M. edulis*) expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle (água salgada) durante 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$. $n = 20$ mexilhões/ tratamento \pm SE (baseados nos dados log transformados)

Os animais expostos a 12,5%, 50% e 100% de esgoto não tratado apresentaram uma alta produção de peróxido de hidrogênio depois de 7 dias de exposição quando comparados com mexilhões do grupo controle ($P < 0,001$; $F = 15,280$) (Figura 8). O aumento da produção de H_2O_2 também foi observado nos mexilhões expostos a 50% e 100% de esgoto não tratado após 14 dias de exposição ($P < 0,001$; $F = 10,416$) (Figura 8) e nos animais expostos a 100% de esgoto não tratado após 21 dias de exposição ($P < 0,001$; $F = 11,671$).

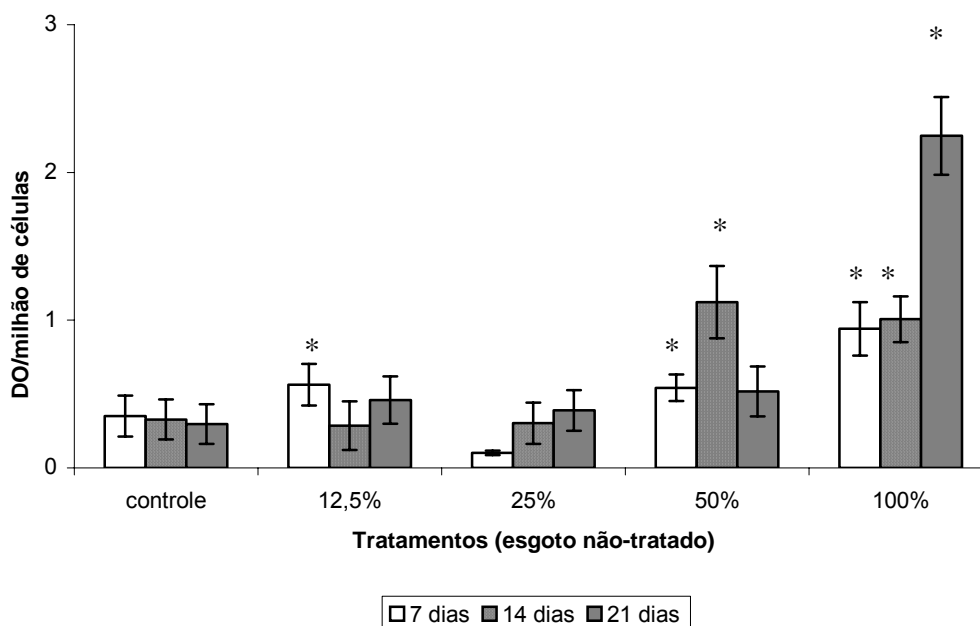


Figura 8. Produção de peróxido de hidrogênio em hemócitos de mexilhões (*M. edulis*) expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle (água salgada) durante 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$. $n = 20$ mexilhões/ tratamento \pm SE (baseado nos dados log transformados).

O resultado da atividade da catalase não apresentou diferença entre os tratamentos, mas a atividade na glândula digestiva dos mexilhões expostos a 50% de esgoto não tratado demonstrou ser elevada após 14 e 21 dias de exposição. Mesmo não sendo estatisticamente diferente, este aumento na atividade da catalase sugere uma elevada concentração de peróxido de hidrogênio na glândula digestiva, como também observado nos hemócitos dos mexilhões expostos a essa mesma concentração (50%). A atividade da catalase, assim como a produção de óxido nítrico não pôde ser medida em mexilhões expostos a 100% de esgoto não tratado após 21 dias de exposição devido à alta taxa de mortalidade nesse grupo (Figura 9).

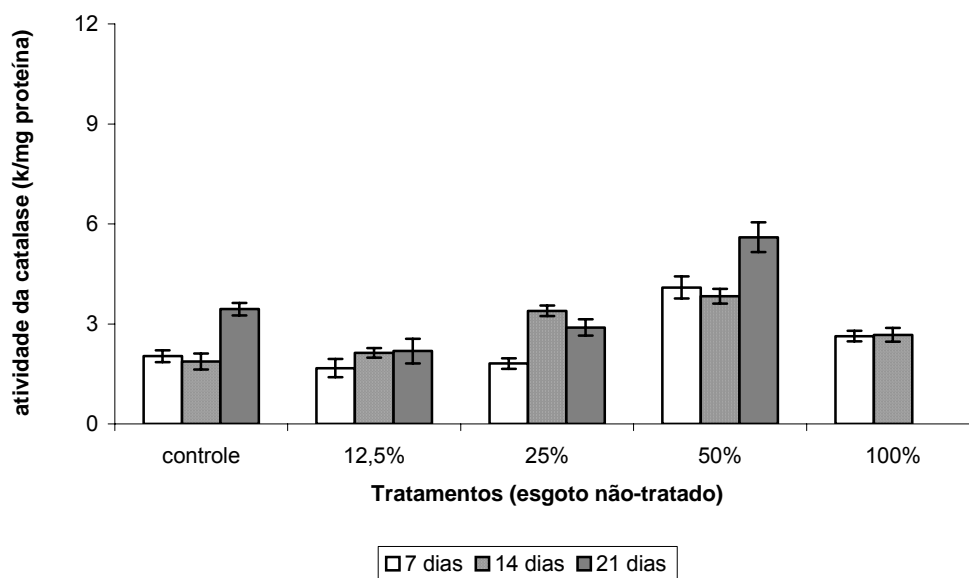


Figura 9. Atividade da enzima catalase em glândula digestiva dos mexilhões (*M. edulis*) expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado durante 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$. $n = 20$ mexilhões/tratamento \pm SE (baseado nos dados log transformados).

O esgoto também interferiu na produção de óxido nítrico quando estimulado por zimosan. Os mexilhões expostos a 50% e 100% de esgoto não tratado apresentaram uma elevada produção de óxido nítrico comparado com mexilhões do grupo controle ($P < 0,001$; $F = 7,406$) após 7 dias de exposição (Figura 10), mas a produção de óxido nítrico não foi afetada em mexilhões após 14 e 21 dias de exposição a todas as concentrações.

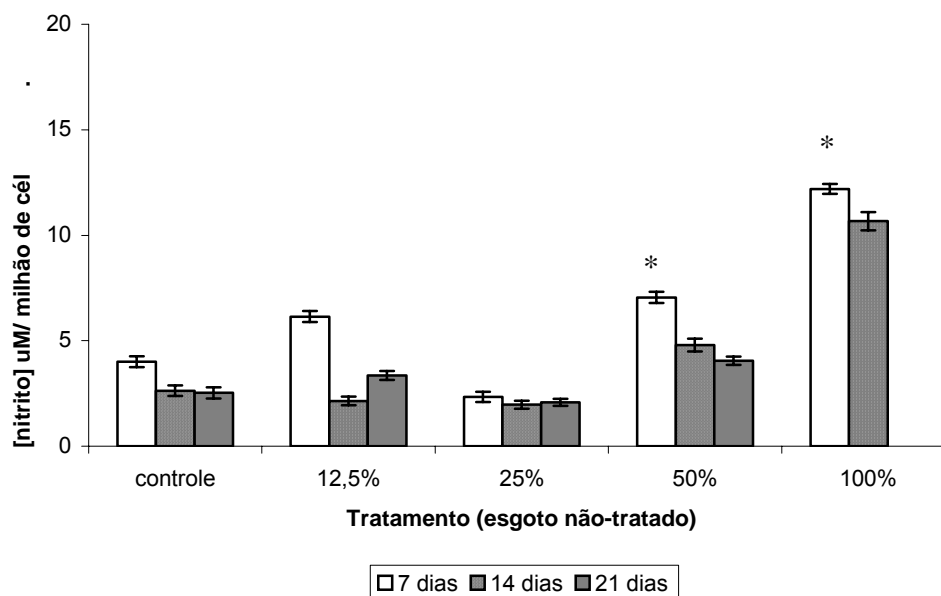


Figura 10. Produção do óxido nítrico em hemócitos dos mexilhões (*M. edulis*) expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado durante 7, 14 e 21 dias. * $P < 0,05$. $n = 20$ mexilhões/tratamento \pm SE (baseado nos dados log transformados).

A contagem de hemócitos também variou de acordo com as concentrações de esgoto testadas: quanto maior a concentração de esgoto testada, menor o número de hemócitos na hemolinfa do *M. edulis*. O número de hemócitos nos animais expostos a 100% de esgoto não tratado foi significativamente menor que o número de hemócitos no grupo controle após 7 ($P = 0,002$; $F = 4,607$), 14 ($P = 0,000$; $F = 10,984$) e 21 dias ($P = 0,000$; $F = 9,191$) de exposição (Figura 11). A viabilidade celular (número de células vivas) foi significativamente menor em animais expostos a 100% de esgoto não tratado se comparado com grupo controle após 14 ($P = 0,001$; $F = 5,917$) e 21 ($P = 0,04$; $F = 3,043$) dias de exposição (Figura 12).

O desafio bacteriológico demonstrou que o grupo controle apresentou uma menor eliminação do *L. anguillarum* (ou seja, um alto número de bactéria infectando os animais do grupo controle após 24h de infecção), mas todos sobreviveram à infecção após 24h. Por outro lado, os mexilhões pré-expostos às concentrações de esgoto não tratado (12,5%, 25%, 50% e 100%) eliminaram mais bactéria comparado com o grupo controle, mas estes grupos apresentaram uma maior mortalidade 24h depois de

infectados pelo *L. anguillarum*. Os mexilhões pré-expostos a 12,5% e 25% de esgoto não tratado foram capazes de sobreviver à infecção bacteriana, e apresentaram uma média de 10^6 e 10^5 bactérias em 200µl de hemolinfa circulante, respectivamente, comparado com animais do grupo controle, os quais apresentaram uma média de 10^9 bactérias em 200µl de hemolinfa (Figura 13A). O grupo exposto a 50% de esgoto não tratado eliminou mais bactérias que o grupo controle (isto é; apenas 10^7 bactérias foram encontradas infectando em 200µl de hemolinfa desses animais), mas este resultado foi também associado com uma mortalidade de 30% dos mexilhões deste grupo após 24 h infectados por *L. anguillarum*. Nenhum animal pré-exposto a 100% de esgoto não tratado sobreviveu ao desafio bacteriológico após 24h de infecção (Figura 13B). Durante as primeiras 12 horas de infecção foi observada uma mortalidade de 40% dos animais pré-expostos a 100% de esgoto não tratado e o restante (60%) morreu ao final do teste (24 horas). Estatisticamente, os grupos pré-expostos a 25% e 50% esgoto não tratado apresentaram uma maior eliminação de bactérias se comparado com o grupo controle ($P = 0,005$; $F = 5,204$) (Figura 13A).

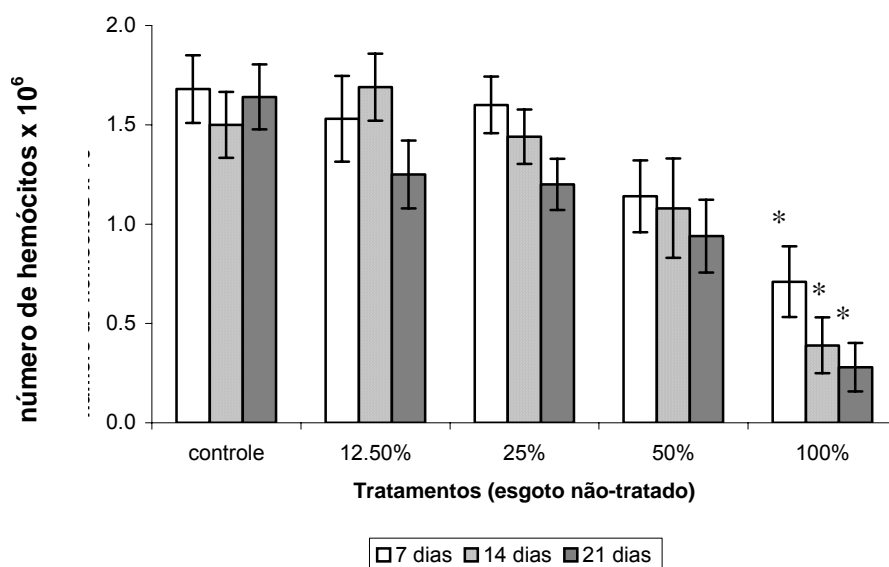


Figura 11. Contagem do número de hemócitos em hemolinfa de *M. edulis* expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle durante 7, 14 e 21 dias de exposição. * $P < 0,05$ $n=20$ mexilhões/tratamento \pm SE (baseado nos dados log transformados).

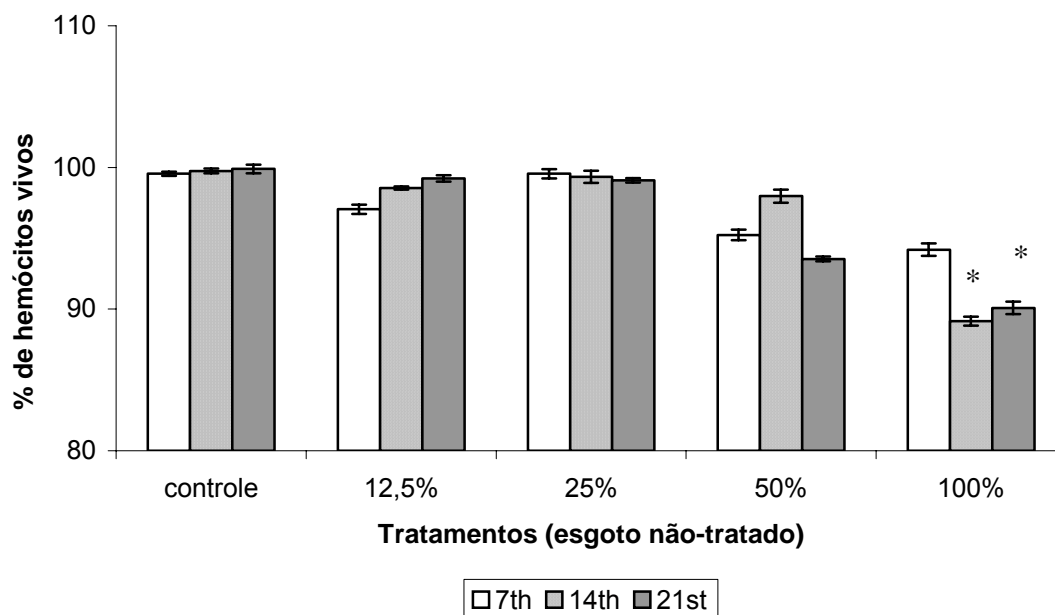


Figura 12. Viabilidade celular (porcentagem de células vivas em relação ao número total de células) em hemócitos de *M. edulis* exposto a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle durante 7, 14 e 21 dias de exposição. * $P < 0,05$ $n= 20$ mexilhões/tratamento \pm SE (baseado nos dados log transformados).

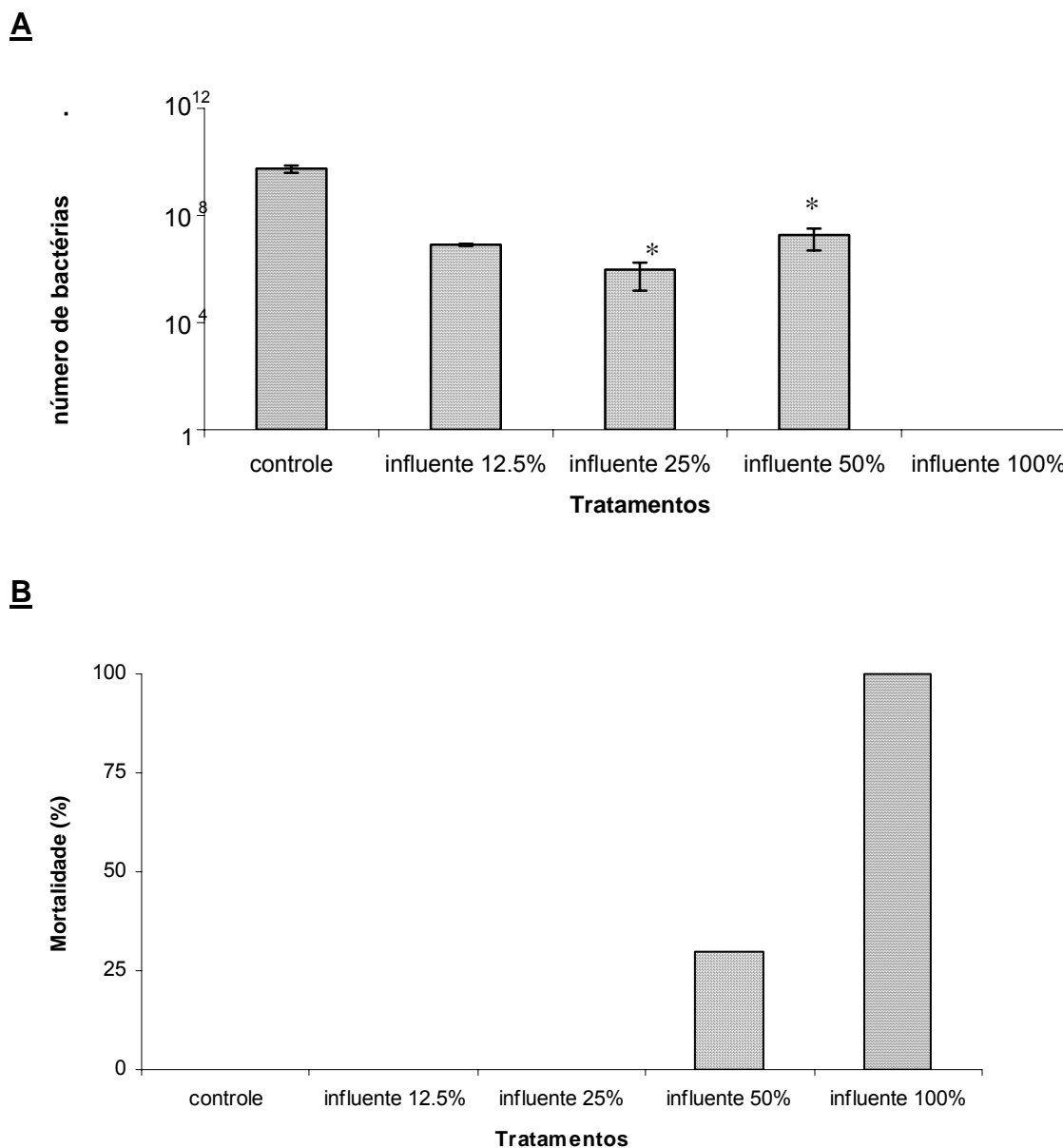


Figura 13. A- Desafio bacteriológico. Efeito da pré-exposição (21 dias) a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle na capacidade de *M. edulis* eliminar bactéria. A- Gráfico expressa o número de bactéria (*L. anguillarum*) infectando 200µl de hemolinfa de *M. edulis* após um período de 24h de infecção bacteriana. B –Mortalidade (%) de *M. edulis* por tratamento, após 24 h de infecção com *L. anguillarum*. * $P < 0,05$ $n = 10$ mexilhões/tratamento \pm SE.

As análises histopatológicas demonstraram a presença de algumas lesões nas brânquias e glândulas digestivas dos animais expostos ao esgoto não tratado. As brânquias dos indivíduos do grupo controle apresentaram uma baixa incidência de lesões ou alterações teciduais. No tecido branquial é possível observar células abfrontais, sinus hemolinfático e células endoteliais e pós-laterais. Da mesma forma nas glândulas digestivas dos mexilhões do grupo controle não houve uma alta ocorrência de alterações (Figuras 14 e 15). As lesões observadas nas brânquias foram: sinus hemolinfático dilatado; variação no número de grânulos de lipofuscina, hiperplasia das células endoteliais ao redor do sinus hemolinfático, infiltração de hemócitos no endotélio branquial, células endoteliais vacuolizadas e com perda de limite celular e fusão lamelar (Figura 14, Tabela 2). Por outro lado, as glândulas digestivas apresentaram: lesão similar a necrose, desorganização e vacuolização das células digestivas que compõem os túbulos (Figura 15, Tabela 3). Não foi encontrada nenhuma alteração na superfície e estrutura dos cílios branquiais analisados através da microscopia eletrônica de varredura.

Mexilhões expostos a todas as concentrações de esgoto não tratado durante 14 e 21 dias apresentaram uma maior diversidade de lesões nas brânquias e glândulas digestivas do que nos animais expostos por 7 dias. A prevalência de *M. edulis* com brânquias apresentando sinus hemolinfático dilatado ($P = 0,001$; $K = 18,606$) e células endoteliais vacuolizadas ($P = 0,012$; $K = 12,936$) foi significativamente maior (41,7% e 41,6%, respectivamente) no grupo exposto a 100% de esgoto não tratado se comparado com grupo controle após 14 dias de exposição (Tabela 2). O número de grânulos de lipofuscina nas brânquias dos animais expostos a 25% e 50% foi significativamente maior ($P = 0,008$; $F = 4,705$) após 14 dias de exposição quando comparado com o grupo controle (Figura 17). O grupo exposto a 50% esgoto não tratado apresentou 36% ($P = 0,014$; $K = 12,531$) dos indivíduos com epitélio das células digestivas desorganizado após 14 dias de exposição e 10% ($P = 0,019$; $K = 11,782$) dos animais com a mesma lesão após 21 dias de exposição, ambos comparados ao grupo controle (Tabela 3).

O índice de lesão confirmou que os animais expostos a 25% e 50% esgoto não tratado apresentaram mais alterações histopatológicas nas brânquias e glândulas digestivas. O grupo exposto a 50% esgoto não tratado apresentou um índice de lesão mais alto para as brânquias ($P = 0,004$; $F = 4,270$) e glândulas digestivas ($P = 0,001$; $F = 7,354$) após 14 dias de exposição se comparado ao grupo controle (Figura 16A). O índice de lesão para brânquias também foi significativamente mais alto para animais expostos a 12,5% esgoto não tratado após 7 ($P = 0,047$; $F = 2,584$) e 21 ($P = 0,046$; $F = 2,600$) dias de exposição se comparado ao grupo controle, enquanto que o índice de lesão para as glândulas digestivas foi maior para os animais expostos a 25% esgoto não tratado após 21 dias de exposição ($P = 0,014$; $F = 3,429$) (Figura 16B). Curiosamente, através do índice de lesão observou-se que existe uma menor presença de lesões em brânquias e glândula digestivas dos mexilhões expostos a 100% de esgoto não tratado quando comparado com todos os outros tratamentos.

TABELA 2 . PREVALÊNCIA (%) DE *M. edulis* APRESENTANDO LESÕES EM BRÂNKIAS APÓS EXPOSIÇÃO A 0% (CONTROLE), 12,5%, 25%, 50% E 100% de esgoto NÃO TRATADO, DURANTE 7, 14 E 21 DIAS DE EXPOSIÇÃO. N=12. * P < 0,05

7 dias de Exposição						14 dias de Exposição					21 dias de Exposição				
Lesões	controle	12,5%	25%	50%	100%	Controle	12,5%	25%	50%	100%	controle	12,5%	25%	50%	100%
Grânulo de lipofuscina	8,3	33,3	36,3	25,0	41,6	8,3	16,7	25,0	25,0	8,3	25,0	40,0	25,0	16,7	no
Dilatação do sinus hemolinfático	No	33,3	no	16,7	33,3	8,3	8,3	8,3	8,3	41,6 *	no	20,0	8,3	8,3	14,3
Hiperplasia do endotélio	No	no	27,3	25	no	No	33,3	16,7	25	no	8,3	30,0	8,3	8,3	14,3
Infiltração de hemócitos	8,3	no	27,3	8,3	33,3	16,7	no	16,7	16,7	8,3	no	no	33,3	25,0	14,3
Endotélio frouxo	No	no	0	8,3	8,3	No	no	no	16,7	16,7	no	no	no	8,3	42,9
Endotélio vacuolizado	No	no	no	no	no	No	no	no	no	41,6*	no	10	no	no	no
Fusão lamelar	no	no	9,0	no	no	8,3	no	no	16,7	8,3	no	no	no	no	14,3

TABELA 3. PREVALÊNCIA (%) DE *M. edulis* APRESENTANDO LESÕES EM GLÂNDULAS DIGESTIVAS APÓS EXPOSIÇÃO A 0% (CONTROLE), 12,5%, 25%, 50% E 100% de esgoto NÃO TRATADO, DURANTE 7, 14 E 21 DIAS DE EXPOSIÇÃO. N= 12. P < 0,05.

7 dias de Exposição						14 dias de Exposição					21 dias de Exposição				
Lesões	controle	12,5%	25%	50%	100%	controle	12,5%	25%	50%	100%	controle	12,5%	25%	50%	100%
Vacuolização	8,0	no	no	27,0	29,0	27,0	20,0	no	no	no	no	no	no	0,2	0,4
Necrose no túbulo digestivo	8,0	no	no	27,0	42,0	9,0	40,0	50,0	45,0	50,0	no	25,0	11,0	60,0	60,0
Desorganização do epitélio dos túbulos	no	no	no	no	no	No	no	no	36,0*	no	no	no	no	10,0*	no

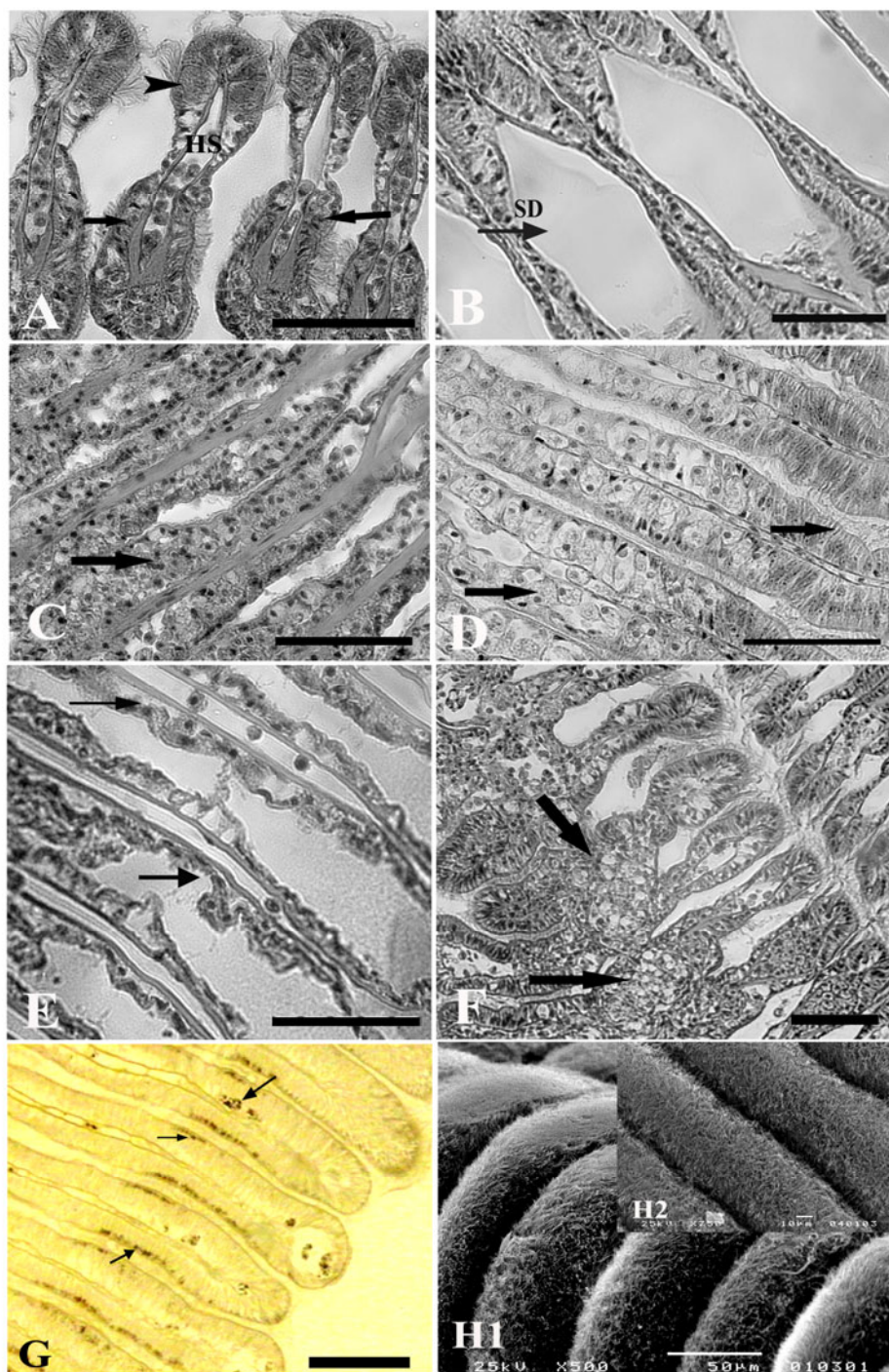


Figura 14. Microscopia de luz de brânquias em *M. edulis* expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle. Corado com hematoxilina e eosina, exceto G (corado com Fontana Masson). A – Controle, 14 dias de exposição. Observe o sinus hemolinfático (HS), células endoteliais (seta), células pós-laterais (cabeça de

seta) com cílios e células frontais. B – Mexilhões expostos a 12,5% esgoto não tratado por 7 dias. Presença de sinus hemolinfático dilatado (SD e seta). C – Mexilhões expostos à concentração de 100% por 7 dias. Observe hiperplasia no endotélio (seta). D – Exposição a 12,5% por 21 dias. Observe a infiltração de hemócitos no endotélio do filamento (seta). E – Exposição a 50% por 21 dias. Descolamento das células endoteliais (seta). F – Exposição a 50% por 14 dias. Fusão lamelar e vacuolização das células (seta). G – Exposição a 100% por 7 dias. Observe a presença de grânulos de lipofusцина através da coloração Fontana – Masson (seta). Barras = 50 μ m. H1 – Controle 14 dias. Microscopia de varredura. Observar os filamentos branquiais. H2 – Exposição a 12,5% por 14 dias. Nenhuma alteração foi observada na superfície das brânquias.

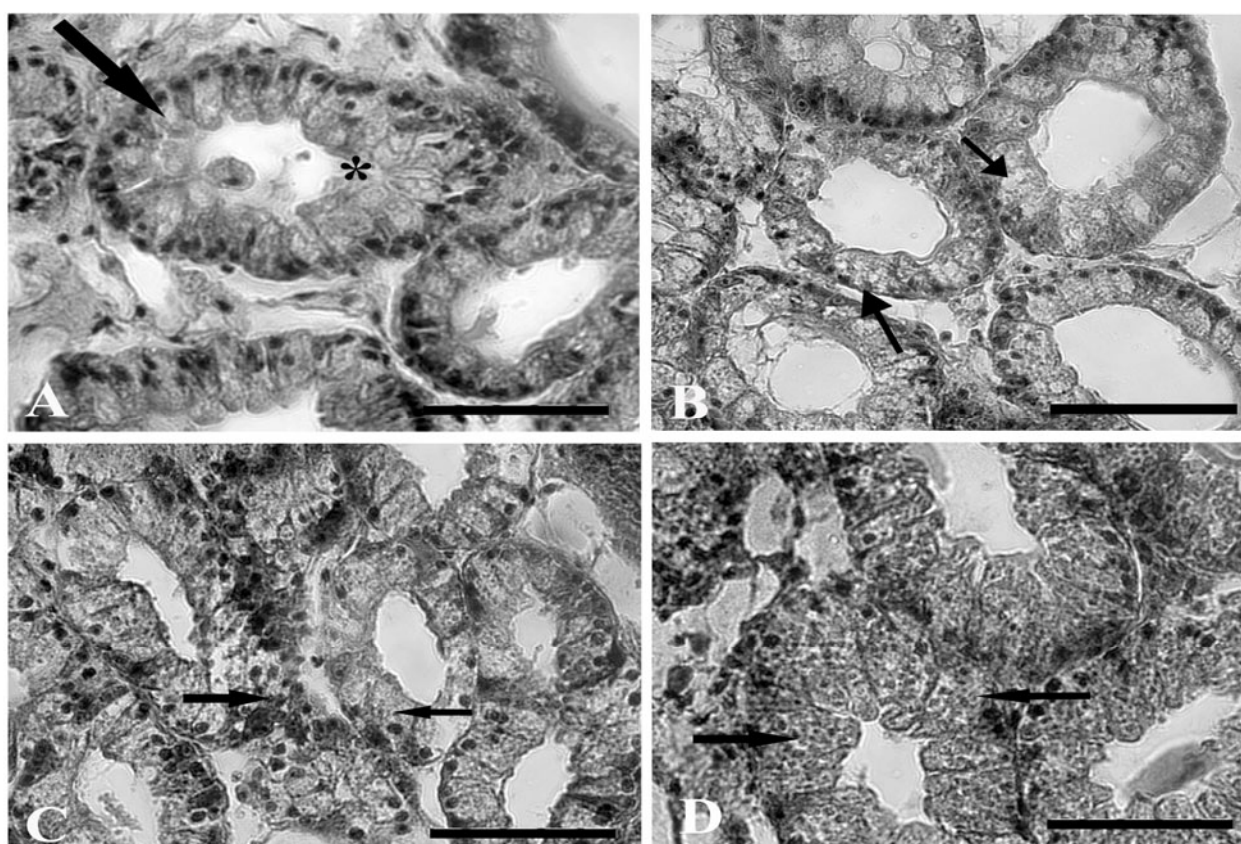


Figura 15. Microscopia de luz de glândula digestiva em *M. edulis* exposto a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle. Corados com hematoxilina e eosina. A – Controle expostos por 14 dias. Observe os túbulos digestivos (*) e células digestivas (seta). B – Exposto a 50% por 7 dias. Observe vacuolização das células digestivas (setas). C – Exposição a 50% por 7 dias. Desorganização celular e perda do limite celular (seta). D – Exposição a 100% por 7 dias. Vacuolização das células (setas). Barras = 50 μ m.

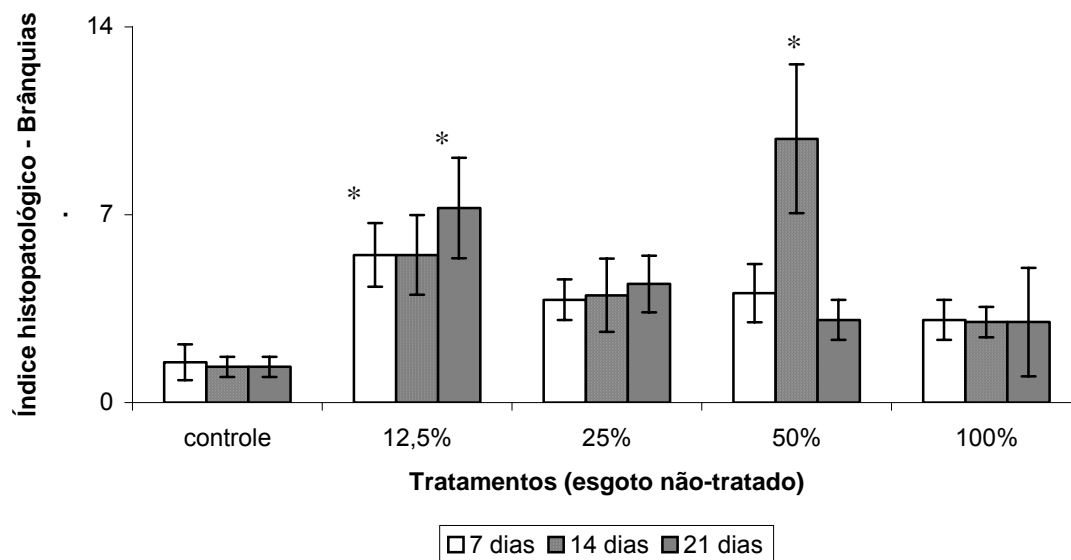
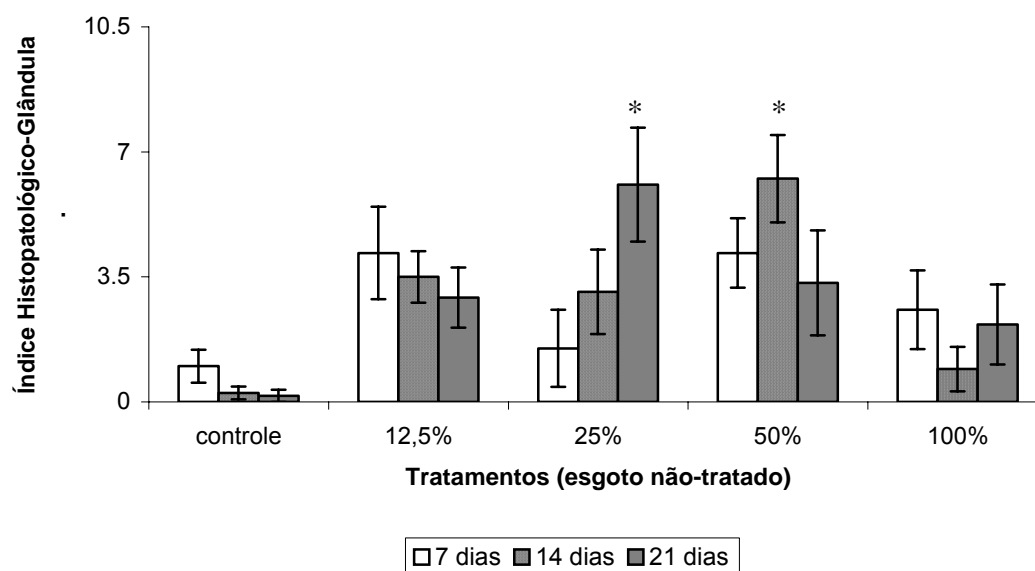
A**B**

Figura 16. Índice de lesão em brânquias **(A)** e glândula digestiva **(B)** de *M. edulis* expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle durante 7, 14 e 21 dias de exposição. * $P < 0,05$ $n = 12$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

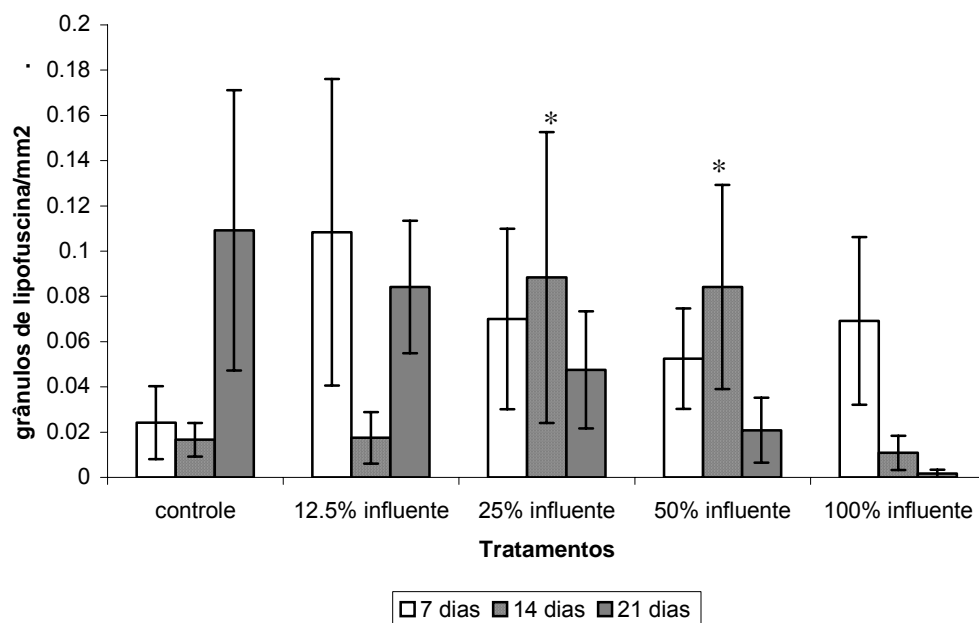


Figura 17. Número de grânulos de lipofuscina por mm^2 no endotélio de brânquias de *M. edulis* expostos a 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado e controle durante 7, 14 e 21 dias de exposição. * $P < 0,05$. Barras representam uma média de 12 brânquias/ tratamento \pm SE.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo forneceu novas informações sobre a resposta do sistema imune da espécie *Mytilus edulis* exposta ao esgoto doméstico não tratado, relacionando as respostas imunológicas com aspectos de relevância ecológica como a resistência a doenças em mexilhões.

Testes de toxicidade utilizando todo efluente (a mistura de compostos) estão sendo desenvolvidos pela agência de proteção ambiental dos EUA - USEPA (USEPA, 2002), para serem utilizados como uma ferramenta no diagnóstico dos efeitos tóxicos destas misturas presentes em efluentes. Desta forma é possível identificar melhor as fontes de toxicidade e também as interações tóxicas entre algumas substâncias. Este estudo procurou desenvolver e padronizar um teste de toxicidade similar, usando esgoto não tratado (esgoto bruto) e expondo *Mytilus edulis* para medir os efeitos em nível de organismo. O desenho experimental escolhido (semi-estático) demonstrou ser eficiente e possível de ser reproduzido.

O esgoto é uma mistura complexa, composta de uma grande variedade de substâncias, cuja presença depende das atividades desenvolvidas pela população ao redor de um determinado estuário, variando ainda ao longo do dia e a estação do ano. A complexidade de substâncias presentes no esgoto dificulta a escolha de biomarcadores utilizados no estudo. HOEGER et al. (2004) usou parâmetros imunológicos, assim como a atividade da EROD e bioacumulação de HPA para medir a toxicidade de diferentes concentrações de esgoto em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). DINIZ et al. (2005) mediu a indução de vitelogenina em carpa (*Cyprinus carpus*) expostas ao esgoto tratado. Ambos os autores utilizaram biomarcadores mais específicos na detecção dos efeitos de HPAs e desreguladores endócrinos presentes no esgoto, respectivamente. Em contraste, o presente estudo utilizou biomarcadores menos específicos, o qual se acredita que responderiam a uma diversidade maior de contaminantes, fornecendo assim uma visão mais generalizada das condições e bem-estar dos mexilhões. Além disso, o uso de múltiplos biomarcadores imunológicos associados com aspectos histopatológicos e bioquímicos permite um melhor

diagnóstico dos efeitos deste tipo de efluente em *M. edulis*, e os riscos para o ecossistema. Outra vantagem é que os biomarcadores imunológicos/bioquímicos e alterações em órgãos e tecidos podem refletir respostas agudas, enquanto que alterações hormonais/reprodutivas são detectadas apenas após exposição crônica aos poluentes.

O presente estudo demonstrou que o sistema imunológico de *M. edulis* pode ser modulado pelo esgoto não tratado, e varia de acordo com a concentração e o tempo de exposição. As respostas imunológicas observadas nos animais no final do período de exposição também foi refletida na capacidade desses organismos em eliminar patógenos. É difícil dizer quais substâncias ou condições ambientais causaram imunomodulação quando o estudo é realizado *in situ*, já que os biomarcadores imunológicos apresentam uma baixa especificidade. No entanto, este estudo foi conduzido em laboratório, sob condições controladas, enfatizando assim, o potencial tóxico das substâncias presentes no esgoto não tratado na espécie em questão. A salinidade (18‰) e o oxigênio dissolvido (não medido durante o estudo) foram dois outros fatores que poderiam estar influenciando a toxicidade do esgoto doméstico não tratado durante o período de exposição. A adição de sal nas amostras de esgoto testadas foi necessária para a sobrevivência da espécie estudada. Neste experimento, a salinidade utilizada foi representativa à salinidade em regiões do estuário de Pictou (onde ocorre o despejo do esgoto tratado). A salinidade pode estar disponibilizando algumas substâncias químicas presentes no esgoto, assim como pode estar diluindo outras. De uma forma geral, o uso de água salgada foi indispensável neste estudo e esse fator pode ter influenciado de alguma forma os efeitos observados nos animais estudados.

A quantidade de ar em todos os aquários foi controlada durante todo o período experimental, mas o oxigênio dissolvido não foi medido. Desta forma, torna-se difícil dizer, se a disponibilidade de oxigênio foi adequada a todos os grupos, especialmente aqueles expostos as mais altas concentrações de esgoto não tratado.

As medidas de amônia total nas amostras de água do tratamento 100% de esgoto não tratado apresentou similaridade com a concentração de amônia total (13,89 mg/l)

detectada em amostras de estações de tratamento de esgoto no Canadá (ENVIRONMENT CANADA, 1997). No Brasil, segundo o artigo 20 do CONAMA, águas salobras (classe 7) (ou seja, estuários) podem apresentar um limite máximo de 0,4 mg/l de amônia não-ionizada.

Os animais expostos às mais altas concentrações de esgoto apresentaram um aumento na atividade fagocítica durante os primeiros dias de exposição seguido de uma diminuição da atividade durante o final da exposição. Uma das possíveis explicações para a alta atividade fagocítica após 7 e 14 dias de exposição está relacionada com a ativação do sistema imune pelas concentrações de 50% e 100% de esgoto não tratado, mas a contínua exposição ao esgoto a essas altas concentrações por mais de 14 dias diminuiu a atividade fagocítica até no final de 21 dias. Baseado nos resultados observados neste estudo é possível dizer que existe uma tendência da atividade fagocítica ser inibida na espécie *M. edulis* quando exposta a altas concentrações de esgoto não tratado por um longo período de tempo. Alguns outros estudos também observaram inibição da atividade fagocítica durante longo período de exposição a poluentes. Por exemplo, GAGNÉ et al. (2002) demonstrou que mexilhões de água doce (*Elliptio complanata*) apresentaram inibição de fagocitose e bioacumulação de metais após serem expostos a um efluente de esgoto doméstico provenientes de um tratamento primário por 62 dias. Outros estudos também demonstraram que bivalves expostos a metais, HPA, DDT e PCBs (todas estas substâncias podem ser encontradas no esgoto) apresentaram inibição na atividade fagocítica dos hemócitos (COLES et al., 1994; GRUNDY et al., 1996 (a); PIPE et al., 1999; SAUVÉ et al., 2002).

A atividade fagocítica ativa a oxidase NADPH, responsável pela explosão respiratória, e produção de espécies reativas de oxigênio (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) (LIVINGSTONE et al., 1990; PIPE, 1992). A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apresentou um comportamento similar à atividade fagocítica, com a exceção no grupo exposto a 100% de esgoto não tratado, onde uma alta produção de H_2O_2 foi observada após 14 dias de exposição. Existem três hipóteses que tentam explicar estes resultados: (1) a alta produção de H_2O_2 foi uma forma de compensar a baixa atividade

fagocítica nessas células; (2) compostos presentes no esgoto afetaram a atividade da enzima catalase, a qual é responsável pela degradação do H_2O_2 nas células. (3) as substâncias presentes no esgoto poderiam estar afetando outras vias de produção e degradação de peróxido de hidrogênio, como por exemplo as citocromos P-450 ou glutathione – S- transferases (GSHs).

A atividade da catalase foi medida na glândula digestiva, pelo fato desse órgão apresentar o maior número de enzimas antioxidantes em mexilhões (LIVINGSTONE et al., 1990). As concentrações de 12,5%, 25% e 50% esgoto não tratado não afetaram a atividade da catalase na glândula digestiva em *M. edulis*, indicando que talvez a alta concentração de peróxido de hidrogênio na hemolinfa desses animais poderia estar mais relacionada com a baixa atividade fagocítica e/ou alterações em outros mecanismos de produção e eliminação de H_2O_2 . Vários estudos demonstraram que contaminantes, tais como: pesticidas, PCBs, HPAs, cobre e misturas complexas (ex: esgoto) aumentaram a atividade da catalase em mexilhões e poliquetas (LIVINGSTONE et al., 1990; PELLERIN – MASSICOTTE, 1994; GERACITANO et al., 2002; TORRES et al., 2002; KHESSIBA et al., 2005). A atividade da catalase também pode ser influenciada pela variação em temperatura, salinidade e intensidade luminosa (POWER e SHEENAN, 1996; KHESSIBA et al., 2005). No entanto, estes fatores abióticos foram controlados durante experimentação em todos os grupos testados. Associando os resultados da atividade da catalase com a produção de peróxido de hidrogênio pode ser dito que a elevada produção do peróxido de hidrogênio esteja sendo influenciada por outras vias metabólicas e não pela atividade da catalase.

A associação de superóxido com óxido nítrico forma peroxinitrito, o qual é considerado um bactericida. Por exemplo, a LD_{50} para destruir *Escherichia coli* é em torno de 250 μM de peroxinitrito (ZHU et al., 1992). A eliminação de bactérias pelos hemócitos é realizada através do processo de fagocitose e também pelo sistema do óxido nítrico (FRANCHINI et al., 1995). Mexilhões da espécie *M. edulis* expostos às concentrações mais altas do esgoto não tratado apresentaram uma alta produção de óxido nítrico. Esta alta produção pode ser um mecanismo compensatório para a baixa atividade fagocítica, ou uma estimulação causada por microrganismos patogênicos,

supostamente presente nas amostras de esgoto não tratado. O sistema imune dos mexilhões demonstrou estar funcionando eficientemente durante os primeiros 7 dias de exposição, mas esta eficiência diminuiu com o aumento do tempo de exposição, sendo evidenciado através da atividade fagocítica e produção de óxido nítrico.

O número de hemócitos também variou dependendo da concentração do contaminante e tempo de exposição complementando os resultados da produção de óxido nítrico e fagocitose. Neste estudo, quanto mais alta a concentração de esgoto testada menor foi o número de hemócitos na hemolinfa dos mexilhões estudados. Este resultado pôde ser explicado através dos dados de viabilidade celular, onde os animais expostos a 50% e 100% de esgoto não tratado apresentaram um menor número de células vivas e saudáveis. O número de hemócitos em bivalves expostos à contaminantes em experimentos em laboratório ou *in situ* tende a aumentar, mas isto nem sempre é uma regra (COLES et al., 1995). O bivalve *Villorita cyprinoide* apresentou uma diminuição no número de hemócitos após exposição ao cobre (SURESH e MOHANDAS, 1990) também observado por e PARRY e PIPE (2004) em *Mytilus edulis* (cobre 0,05 ppm), apresentando resultados similares aos encontrados neste estudo em mexilhões expostos à concentração de 100% de esgoto não tratado.

A infiltração dos hemócitos no tecido branquial e a dilatação do sinus hemolinfático nas brânquias dos mexilhões *M. edulis* expostos ao esgoto não tratado também foram indicativos de resposta imunológica no tecido. A diminuição no número de hemócitos na hemolinfa pode também ser explicado pelas alterações histopatológicas observadas nas brânquias, tal como a infiltração dos hemócitos no endotélio branquial em mexilhões expostos a 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado. Esta alteração é descrita como uma resposta imunológica a qual é um indicativo de resposta inflamatória no tecido.

Além disso, algumas lesões na glândula digestiva, tais como necrose das células dos túbulos digestivos e grânulos de lipofuscina nas brânquias também podem estar relacionadas com respostas imunológicas. A ocorrência de áreas necróticas no tecido após exposição à contaminantes têm sido associada com ativação da resposta imunológica e atividade fagocítica (RABITTO et al., 2005). De acordo com OLIVEIRA

RIBEIRO et al. (2005) e RABITTO et al. (2005), estas alterações histopatológicas representam danos estruturais e funcionais irreversíveis provocando consequências negativas ao funcionamento do tecido e do órgão.

Estudos recentes têm demonstrado que a presença de grânulos de lipofuscina pode ser um biomarcador eficiente de estresse celular, se associado com alterações lisossomais em glândulas digestivas de bivalve (AU, 2004; MOORE et al., 2005; DONDERO et al., 2006; NIGRO et al., 2006; ZORITA et al., 2006). Neste trabalho, os grânulos de lipofuscina foram encontrados em grande número nas brânquias da espécie estudada, ao invés das glândulas digestivas; corroborando com o trabalho de GÓMEZ – MENDIKUTE et al. (2005). A lipofuscina é um produto do ataque oxidativo em proteínas e lipídios e podem acumular-se nos lisossomos, onde podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) devido a uma associação com ferro, causando inibição da função lisossomal, resultando em alterações nos processos fagocíticos e autofágicos (AU, 2004; MOORE et al., 2006). Vários estudos demonstraram que mexilhões expostos ao cobre, PAHs e PCBs apresentaram um alto número de grânulos de lipofuscina na glândula digestiva (AU, 2004; DONDERO et al., 2006; ZORITA et al., 2006). O alto número de grânulos de lipofuscina encontrados nas brânquias dos animais expostos a 25% e 50% esgoto não tratado após 14 dias de exposição confirmou a modulação do sistema imune nesses organismos, apesar do baixo número de grânulos em mexilhões expostos a 100% de esgoto não tratado. A exocitose de lisossomos carregados com xenobióticos e lipofuscina já foi previamente proposto como uma possível forma de detoxificação (CAJARAVILLE et al., 1995; CANCIO et al., 1995; ZORITA et al., 2006) e este mecanismos fisiológico pode ser uma explicação para o baixo número de grânulos de lipofuscina nas brânquias de mexilhões expostos a 100% de esgoto não tratado, mas esta especulação não pôde ser confirmada neste estudo, uma vez que esse parâmetro não foi medido.

As análises histopatológicas também apresentaram lesões não relacionadas com as respostas imunológicas, tais como, vacuolização do epitélio digestivo das glândulas, desorganização do epitélio digestivo, fusão lamelar nas brânquias, hiperplasia e perda dos limites das células endoteliais das brânquias.

Alguns estudos demonstraram que algumas espécies de mexilhões expostos ao óleo diesel e metais apresentam glândula digestiva com células vacuolizadas (SUNILA, 1987; LOWE, 1998; NAJLE et al., 2000; Snyman et al., 2005). A vacuolização celular pode estar relacionada com o acúmulo de lipídios no epitélio digestivo, mas ainda não é possível saber se este acúmulo está relacionado com o catabolismo de lipídios ou com o aumento da síntese de lipídios. O acúmulo de lipídio pode ser um processo fisiológico normal, mas também pode ser um mecanismo de defesa contra contaminantes lipossolúveis (BIAGIANTI – RISBOURG et al., 1997).

Outras alterações, como a fusão lamelar, hiperplasia e perda do limite celular no endotélio branquial foram já descritas em estudos anteriores, onde algumas espécies de mexilhões foram expostas ao cobre, cádmio e óleo diesel e também em estudos de monitoramento de efluentes provenientes de metalúrgicas (SUNILA, 1986; SUNILA, 1987; AUFFRET, 1988). Todas essas alterações no tecido branquial podem interferir nas trocas gasosas, osmolaridade e absorção de alimento pelo epitélio, comprometendo o crescimento e sobrevivência dos organismos.

Este estudo levantou algumas questões referentes à modulação do sistema imune e as alterações histopatológicas observadas em *M. edulis* expostos por 21 dias ao esgoto não tratado. Será que o sistema imune e órgãos estudados poderiam apresentar alguma recuperação ou adaptação à fonte de estresse (esgoto) durante um período mais prolongado de exposição? Será que essa recuperação dependeria da concentração de esgoto testada, ou animais expostos a baixas concentrações de esgoto por um longo período apresentariam os mesmos efeitos que animais expostos às altas concentrações por um curto período de exposição? MAYRAND et al. (2005) observou que os hemócitos de *M. edulis* podem se recuperar após terem sido expostos a áreas receptoras de efluentes industriais por um longo período de tempo e transplantados para áreas limpas, mas essa recuperação foi apenas parcial, pois foi evidenciado que esses animais transplantados apresentaram uma menor capacidade de eliminar bactéria (*Vibrio*) comparado com os indivíduos expostos apenas às áreas não-contaminadas. Desta forma, não é possível dizer que o sistema imune de *M. edulis* exposto ao esgoto apresentaria a capacidade de se recuperar quando expostos às

baixas concentrações ou a um longo período de tempo. Além disso, não existe nenhuma informação sobre a recuperação de órgãos e tecidos de bivalves após serem expostos ao esgoto.

Através do desafio bacteriológico foi possível avaliar melhor o potencial efeito do esgoto não tratado na resposta imune de *M. edulis*. Este teste foi importante para estimar a amplitude da toxicidade do esgoto em um curto período de exposição. Além disso, o desafio bacteriológico refletiu o desempenho do sistema imune dos mexilhões após 21 dias expostos ao esgoto. MAYRAND et al. (2005) e ST-JEAN et al. (2002 b e 2003) utilizaram o desafio bacteriológico e demonstraram que este teste é uma ferramenta útil para medir a toxicidade de vários contaminantes em *M. edulis*. Estes autores também enfatizaram a importância em relacionar a modulação do sistema imune com a capacidade de defesa contra patógenos.

A imunidade contra patógenos em invertebrados envolve mecanismos celulares e humorais (MAYRAND et al., 2005). Os resultados apresentados neste estudo sugerem que fagocitose e moléculas citoplasmáticas podem estar participando da eliminação de bactérias para os mexilhões expostos a 12,5%, 25% e 50% esgoto não tratado, mas os resultados também demonstraram que os mexilhões expostos a 50% e 100% de esgoto não tratado apresentaram uma alta mortalidade após terem sido infectados 24 horas com *L. anguillarum*. Esta alta mortalidade reflete a ineficiência do sistema imune desses animais e também pode estar relacionada com outros efeitos causados pelo esgoto nos processos fisiológicos responsáveis para a manutenção da vida desses mexilhões infectados.

6. CONCLUSÃO

Sumarizando, este primeiro capítulo revelou que o esgoto não tratado modulou alguns dos parâmetros imunológicos, além de causar alterações nas brânquias e glândulas digestivas do mexilhão azul *Mytilus edulis*.

Estas imunomodulações e alterações histopatológicas foram observadas em maior prevalência nos mexilhões expostos às altas concentrações de esgoto não tratado (50% e 100%) durante um relativo curto período de exposição. Os efeitos causados no sistema imune de *M. edulis* foram refletidos na capacidade desses animais eliminarem patógenos, evidenciado através do desafio bacteriológico.

Apesar deste estudo demonstrar que o esgoto não tratado causou alterações no sistema imune e tecidos de *M. edulis*, estes resultados não podem ser extrapolados diretamente para o ambiente natural ou para populações naturais de *M. edulis*. No entanto, a informação produzida neste estudo pode ajudar na escolha e interpretação de biomarcadores para monitoramentos em áreas receptoras de esgoto.

Capítulo II

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE ESGOTO TRATADO E NÃO TRATADO NA ESPÉCIE *Mytilus edulis* EXPOSTA EM REGIÕES ESTUARINAS, COM BASE NOS DADOS DE BIOENSAIO

Departamento de Biologia Celular
Universidade Federal do Paraná

Orientação:

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Departamento de Biologia Celular/UFPR

Co-orientação:

Dra. Sylvie St-Jean
Environment Canada (atualmente trabalhando para Jacques Whitford Ltda.)

1. INTRODUÇÃO

Geralmente, as regiões costeiras são as que mais sofrem com o despejo indiscriminado de esgoto tratado e não tratado. Hoje uma grande quantidade dos rejeitos produzidos nos centros urbanos e industriais são despejados nos estuários na sua maioria sem tratamento adequado (ROY et al., 2001). Estes ecossistemas apresentam uma grande importância ecológica pois funcionam como berçários de muitas espécies marinhas, principalmente peixes, sendo algumas dessas espécies de grande valor econômico (ALLANSON e BAIRD, 1999).

O presente estudo foi desenvolvido na região estuarina de *Pictou, Nova Scotia*, Canadá devido à importância deste tipo de ecossistema e também devido à falta de informação sobre o possível impacto do esgoto despejado neste tipo de ambiente.

De acordo com um relatório desenvolvido pelo ENVIRONMENT CANADA (2001), o estresse causado pelo esgoto em ambientes aquáticos depende de vários fatores, entre eles: a quantidade de efluente despejado, a qualidade desse efluente, as características do ambiente receptor, a capacidade de assimilação desse ambiente, o clima e a estação do ano. Além disso, a dureza da água, a temperatura, o pH, a concentração de nutrientes e metais são características importantes do ambiente receptor. Qualquer diferença nessas características físicas e químicas podem resultar em diferentes graus de toxicidade para os organismos aquáticos. A capacidade de assimilação do ambiente receptor varia ainda com o tempo e depende do volume despejado e do fluxo de água no ponto de despejo. O clima e estação do ano influenciam a temperatura do esgoto e do ambiente receptor, e também pode afetar a concentração de oxigênio dissolvido. Todos esses aspectos são cruciais na detecção de toxicidade do esgoto em organismos aquáticos.

Este mesmo relatório do *Environment Canada* descreve os 3 principais tipos de tratamento de esgoto. Todo esgoto coletado e enviado para uma central de tratamento recebe um tratamento preliminar onde todas as partículas sólidas maiores e areia é retirada usando grades de retenção. O tratamento mais simples e menos eficaz é o primário. Este tratamento baseia-se na remoção dos sólidos em suspensão através de decantadores, formando o lodo primário bruto (um exemplo são as fossas sépticas),

apresentando uma eliminação média de 30% da demanda bioquímica de oxigênio (DBO). O tratamento secundário também se concentra na remoção dos sólidos suspensos de forma mais eficiente que o primário. Este processo utiliza bactérias aeróbicas, as quais degradam as partículas orgânicas presentes no esgoto e pode alcançar uma diminuição na DBO de até 90%. O tratamento terciário remove poluentes específicos (micronutrientes e patógenos), além de outros poluentes não retidos nos tratamentos primário e secundário, como por exemplo: nitrogênio e fósforo, além de remoção completa de matéria orgânica. Existe ainda o processo de desinfecção, o qual elimina a totalidade de patógenos do esgoto, via lagoa de maturação, cloração, ozonização ou radiação ultravioleta. Entre esses processos, o mais usado e de menor custo é a cloração, mas pode gerar subprodutos tóxicos como organoclorados, mas isto pode ser evitado através da decoloração utilizando SO_2 .

Estudos demonstram que *Mytilus trossolus* exposto à efluentes contendo esgoto não tratado apresentaram uma baixa produção de filamentos bissais e diminuição da tolerância à exposição ao ar (MOLES e HALE, 2003). Adicionalmente, *Eliptio complanata* (mexilhão de água doce) exposto ao esgoto após passar por tratamento primário apresentou um aumento na atividade das oxidases de funções mistas, nível de metalotioneínas em brânquias, quantidade de lipídio total e danos em DNA (GAGNÉ et al., 2002). Outros estudos também demonstraram que mexilhões expostos à HPA e metais (Ag, Cd, Hg e Zn), ambos os presentes no esgoto frequentemente, sofreram a inibição da atividade fagocítica (GRUNDY et al., 1996 (b); SAUVÉ et al., 2002). Estudos realizados anteriormente demonstraram que mexilhões (*Mytilus edulis*) expostos em áreas no Porto de *Pictou* apresentaram dificuldade em eliminar bactérias e bioacumularam metais (ST-JEAN et al., 2003). Existem poucos estudos relacionando os efeitos tóxicos do esgoto e invertebrados marinhos. Grande parte da informação sobre toxicidade do esgoto na biota aquática é baseado em estudos utilizando teleósteos como bioindicadores.

TILTON et al. (2002) demonstraram que machos de *catfish* expostos em gaiolas à uma região recebendo esgoto tratado primariamente apresentaram variação na atividade estrogênica entre as diferentes estações do ano. DINIZ et al. (2005) também

observaram que carpas (*Cyprinus carpio*) apresentaram respostas estrogênicas (indução de vitelogenina) quando expostas ao esgoto tratado. Adicionalmente, HOEGER et al. (2004) observaram uma diminuição na circulação de linfócitos em trutas *Oncorhynchus mykiss* após exposição ao esgoto tratado em nível terciário.

O presente estudo utilizou biomarcadores imunológicos, histopatológicos e bioquímicos já padronizados e utilizados no experimento em laboratório apresentado no capítulo I. Os biomarcadores imunológicos, bioquímicos e histopatológicos fornecem informações sobre a ação tóxica do esgoto em nível de organismo, no entanto é muito difícil extrapolar esses dados com segurança para níveis mais complexos de organização biológica como população, comunidades e ecossistemas. Sendo assim, este estudo padronizou um método conhecido como desafio bacteriológico para a espécie *Mytilus edulis*, na tentativa de verificar se os efeitos medidos do esgoto em nível celular e subcelular estariam sendo refletidos em nível sistêmico.

Estudos *in situ* são importantes para determinar as condições de um ecossistema aquático e da biota. No entanto se estes resultados podem ser agregados aos dados obtidos em laboratório é possível compreender melhor as relações entre contaminantes, fatores ambientais e biota. Como já apresentado no Capítulo I, um bioensaio foi desenvolvido para testar a toxicidade de amostras de esgoto não tratado na estação de tratamento de esgoto em *New Glasgow*. Os resultados deste estudo em laboratório foi usado neste Capítulo II como uma base de informações sobre a ação do esgoto em altas e relativamente baixas concentrações (controle, 12,5%, 25%, 50% e 100% de esgoto não tratado), sendo importante ressaltar que altas concentrações de esgoto (50% e 100%) modularam o sistema imune do *M. edulis* enquanto que as baixas concentrações não afetaram o sistema imune quando testado em laboratório por 21 dias.

Estudos *in situ* podem apresentar resultados bem diversos daqueles observados em laboratório devido às flutuações das condições ambientais não controladas experimentalmente. A idéia principal no entanto é utilizar o resultado do Capítulo I como uma fonte de informação sobre o que se pode esperar encontrar no estudo de campo.

2. OBJETIVOS

- Estudar os efeitos tóxicos do esgoto tratado e não tratado despejados na região estuarina de *Pictou*, Nova Scotia Canadá na espécie *Mytilus edulis*, através de exposição subcrônica;

- Avaliar o efeito tóxico do esgoto tratado e não tratado despejados em áreas receptoras de esgoto através de biomarcadores imunológicos e bioquímicos (atividade fagocítica, produção de espécies reativas de oxigênio e atividade da catalase).

- Avaliar o efeito tóxico do esgoto tratado e não tratado despejados em áreas receptoras de esgoto através de biomarcadores morfológicos (microscopia de luz, eletrônica de varredura).

- Verificar se as possíveis alterações imunológicas e bioquímicas estariam afetando a capacidade dos animais eliminarem bactérias, através de uma desafio bacteriológico.

- Verificar se os mesmos biomarcadores utilizados nos estudos em laboratório são sensíveis ao mesmo tipo de efluente no ambiente natural.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

Este estudo foi desenvolvido no Porto de Pictou e Rio Leste (*East river*). Estas áreas estão localizadas no Nordeste da Província de *Nova Scotia* no Estreito de *Northumberland*. O Porto de *Pictou* é formado pela confluência dos Rios Leste, Oeste e Médio (PAINTER e STEWART, 1992) (Figura1).

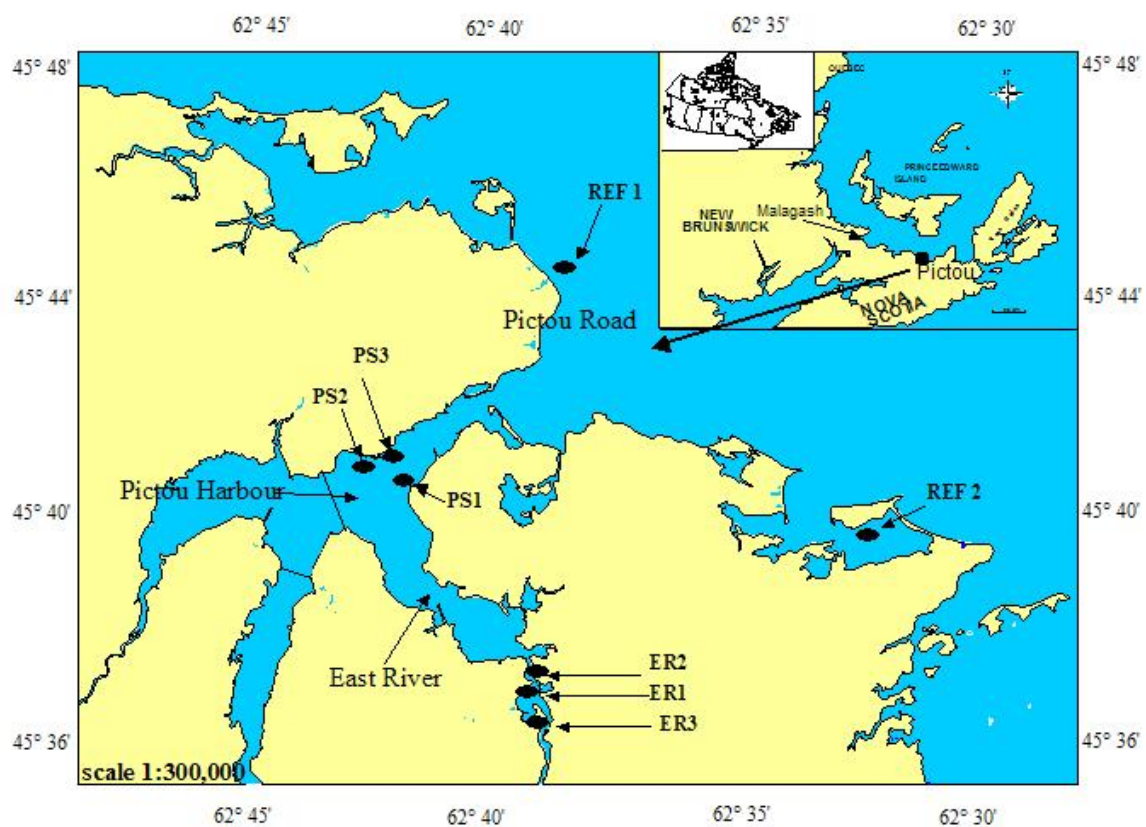
O Porto de *Pictou* é um importante estuário para comércio e seu histórico de contaminação ambiental inclui a presença de coliformes fecais, metais, alto nível de nutrientes, PCBs (bifenilas policlorinadas), HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), esgoto doméstico, efluente de indústria de papel entre outros (PAINTER e STEWART, 1992).

Oito áreas foram selecionadas seguindo um gradiente de diluição de três pontos de despejo de esgoto. O Rio Leste recebe esgoto doméstico após passar pelo tratamento secundário na estação de tratamento em *New Glasgow* e os mexilhões foram expostos em 3 áreas de estudo (ER1, ER2, ER3) neste rio (Figura 1). ER1 e ER2 localizam-se 50 m à montante e à jusante ao local do despejo do efluente de esgoto tratado, respectivamente. Enquanto que ER3 fica a 100 m à montante deste efluente (Figura 1).

Outras 3 áreas foram selecionadas no Porto de Pictou (PS1, PS2, PS3) (Figura 1). As áreas PS1 e PS2 localizam-se na desembocadura de dois efluentes de esgoto doméstico não tratado (ambos provenientes da cidade de Pictou), enquanto que PS3 encontra-se 300 m à jusante da desembocadura PS2 (Figura 1).

Duas outras áreas foram consideradas referências (REF1 e REF2). REF1 localiza-se a 200 m distante da costa na Ilha de *Merigomishi* e REF2 fica a 200 m distante da costa do Porto de *Chance*, ambas localizadas no Estreito de *Northumberland*, mas distantes da influência do esgoto e outras fontes de contaminação (Figura 1).

A



B

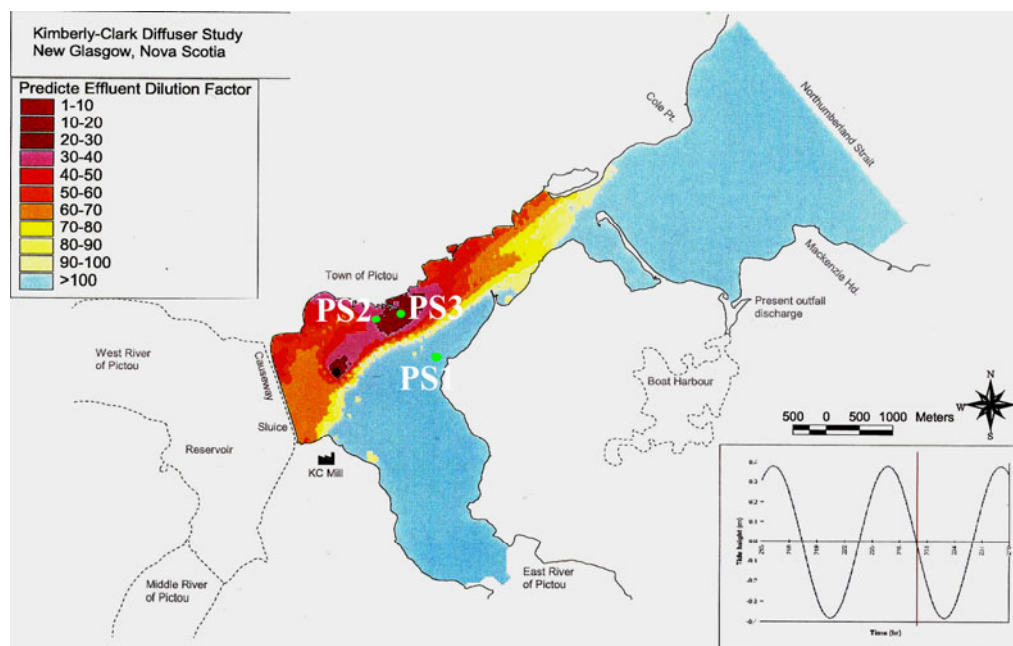


Figura 1. A. Mapa da região estuarina do Porto de *Pictou* indicando (pontos pretos) todas as áreas estudadas. REF1 e REF2 = áreas referência; PS1, PS2, PS3 =

áreas receptoras de esgoto não tratado; ER1, ER2, ER3 = áreas receptoras de esgoto tratado. **B.** Mapa com um modelo sobre o possível fator de diluição do esgoto da cidade de *Pictou*, *Nova Scotia*, Canadá. Pontos verdes representam as áreas onde os mexilhões foram expostos (fonte: Kimberly-Clark estudo de difusão).

3.2. Estudo *in situ*

Como estabelecido para o experimento em laboratório, os mexilhões foram obtidos na fazenda de aquacultura na Baía de *Malagash*, *Nova Scotia*, cultivados em uma pequena área sem a influência de efluentes industriais ou esgoto (população da área < que 2000 pessoas). Após receber os mexilhões, estes foram colocados em sacolas construídas de malhas de plásticos (Figura 2) e mantidos em gelo durante transporte, preparo das gaiolas e deposição das gaiolas nas respectivas áreas de estudo. Oito gaiolas, contendo 50 mexilhões (< 50 mm comprimento) cada (10 mexilhão por sacola), foram colocadas a 0,9 m de distância do fundo do estuário em aproximadamente 4,5 a 5,5 m de profundidade. O estudo iniciou-se em maio/2005 e os mexilhões foram expostos aos efluentes durante 90 dias. No final de julho/2005, dez mexilhões foram randomicamente coletados em cada gaiola para a avaliação do sistema imune. Outros 10 animais foram da mesma forma selecionados para o desafio bacteriológico e outros 15 foram utilizados para as análises histológicas e atividade da catalase. Fatores ambientais, tais como: temperatura, salinidade e oxigênio dissolvido foram medidos mensalmente durante o período de exposição, mas informações sobre estes parâmetros para os últimos cinco anos estão disponíveis em outros estudos nessas áreas.





Figura 2. A – Gaiolas de PVC. B – Mexilhões prontos para serem colocados nas áreas de estudo. C- Note que os mexilhões estão em sacolas plásticas amarradas nas gaiolas.

3.3. Construção das gaiolas

A gaiola foi desenvolvida segundo ST-JEAN et al. (2003). Estas apresentam um formato cúbico (1 m^3) e foram construídas com tubos de PVC rígido (3,0 cm de diâmetro). Os tubos foram colados e rebites de metal foram usados como reforço. Em cada gaiola foram colocadas 5 sacolas de plástico contendo 10 mexilhões em cada uma delas. As sacolas de 10 cm de diâmetro e uma malha com perfurações de 5 mm foram amarradas à gaiola (Figura 2).

3.4. Extração da hemolinfa

Após 90 dias de exposição às áreas receptoras do esgoto, foram amostrados 700 μl de hemolinfa do músculo adutor de cada mexilhão, seguindo o método descrito no capítulo I, desenvolvido por ST-JEAN et al. (2003). Essa hemolinfa foi diluída 1:1 em tampão trizma (TBS) pH 8,4 e osmolaridade de 930 mOsm. Fagocitose, contagem de hemócitos e produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico foram medidas nestas amostras de hemolinfa. A solução hemolinfa/TBS foi transferida para microplacas de 96

poços, sendo utilizada em triplicatas para cada ensaio imunológico: 3 x 100 µl para fagocitose e H₂O₂, 100 µl para contagem de hemócitos e 6 x 100 µl para produção de óxido nítrico.

3.5. Ensaaios Imunológicos e Bioquímicos

As metodologias para medir a atividade fagocítica, contagem de hemócitos e produção de H₂O₂ e óxido nítrico foram as mesmas descritas no capítulo I e seguem nos anexos 1, 2, 4 e 5.

A atividade da catalase foi medida nas glândulas digestivas de 15 mexilhões e o mesmo método descrito no capítulo I foi utilizado neste estudo (Anexo 8).

3.6. Histopatologia

Cinco mexilhões de cada área amostrada tiveram suas brânquias e glândulas digestivas coletadas e preservadas em ALFAC durante 16 horas e após foram mantidas em álcool 70% até processamento. Os métodos histológicos para o preparo e análise das amostras de tecidos foram os mesmos utilizados no capítulo I (Anexo 6). Outros 5 animais tiveram suas brânquias amostradas e fixadas em Glutaraldeído 3% para análises de microscopia eletrônica de varredura e seguiram a mesma metodologia descrita no capítulo I (Anexo 7). O índice de lesão também foi desenvolvido seguindo os procedimentos do estudo em laboratório.

3.7. Desafio Bacteriológico

Os mexilhões pré-expostos às áreas receptoras de esgoto foram infectados com a bactéria *Listonella anguillarum* (200 µl) e analisados após 24h. A mesma metodologia e o mesmo número de bactérias injetadas nos animais expostos ao esgoto em laboratório foi utilizado neste estudo (10^{17} bactérias). O método de contagem das bactérias foi o mesmo utilizado no capítulo I.

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Systat 10® (SPSS Inc., Chicago). A distribuição das variáveis foi testada para homogeneidade e normalidade utilizando plots de probabilidade. Os desvios (quando observados) foram

corrigidos através da função log transformadora. As diferenças em atividade fagocítica, produção de H_2O_2 e óxido nítrico, a contagem de hemócitos, os dados do desafio bacteriológico, atividade da catalase, o número de grânulos de lipofuscina e também os índice de lesões foram determinados através da análise de variância (one-way ANOVA) seguida do a posteriori de Tukey, onde as áreas estudadas foram consideradas como variáveis independentes. As diferenças significantes foram consideradas quando $P < 0,05$. O teste não-paramétrico Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os dados histopatológicos, devido a natureza destes dados (avaliação visual dos ranks de categorias ao invés de medida contínua). As análises foram seguidas pelo pós teste de múltipla comparação não-paramétrica (one-tailed) comparando a média do ranking de cada área estudada (REF1, REF2, ER1, ER2, ER3, PS1, PS2, PS3) com o controle, independentemente (ZAR, 1996).

4. RESULTADOS

As águas das áreas receptoras de esgoto tratado apresentaram uma média de 61,4% de oxigênio dissolvido, enquanto áreas receptoras do esgoto não tratado apresentaram 70% e as áreas de referência apresentaram 81% de oxigênio dissolvido. A temperatura média entre as áreas estudadas variou de 17°C a 22°C e a salinidade foi em torno de 25‰ a 30‰ durante o período amostral. Simultaneamente a este estudo, um grupo de pesquisa do Environment Canada desenvolveu um estudo para determinar as concentrações de produtos farmacêuticos na água e em *M. edulis* expostos às mesmas áreas receptoras. Em anexo (Anexo 10) é possível observar a medida de outros parâmetros físico-químicos das áreas estudadas medido por este outro grupo de pesquisa.

A sobrevivência dos mexilhões das áreas de referência foi de 90% após 90 dias de exposição. A mortalidade mais alta foi observada nas áreas que recebem esgoto tratado (ER1 – 60%; ER2 – 18%; ER3 – 25%), seguido das áreas que recebem esgoto não tratado (PS1 – 16%; PS2 – 29% e PS3 – 13%).

Durante os 90 dias de exposição, foi observado que o esgoto despejado nas áreas estudadas tem capacidade de modular o sistema imunológico do *M. edulis*. Os animais coletados nas áreas recebendo esgoto não tratado (PS1, PS2 e PS3) apresentaram uma alta atividade fagocítica se comparado com os mexilhões das áreas REF1, REF2, ER1, ER2 e ER3 ($P = 0,001$; $F=3,448$) (Figura 3). Esse mesmo grupo de mexilhões (PS1, PS2 e PS3) apresentou uma alta produção de H_2O_2 quando comparado com os das áreas REF1, REF2, ER1, ER2 e ER3 ($P= 0,001$; $F= 46,012$) (Figura 4). A produção de óxido nítrico também foi elevada nos animais expostos ao esgoto não tratado se comparado com os expostos as áreas REF1, REF2, ER1, ER2 e ER3 ($P=0,001$; $F= 27,469$) (Figura 5). Nenhuma diferença foi observada na atividade fagocítica e/ou produção do peróxido de hidrogênio e óxido nítrico entres as áreas à jusante e à montante ao local de despejo do esgoto tratado e não tratado.

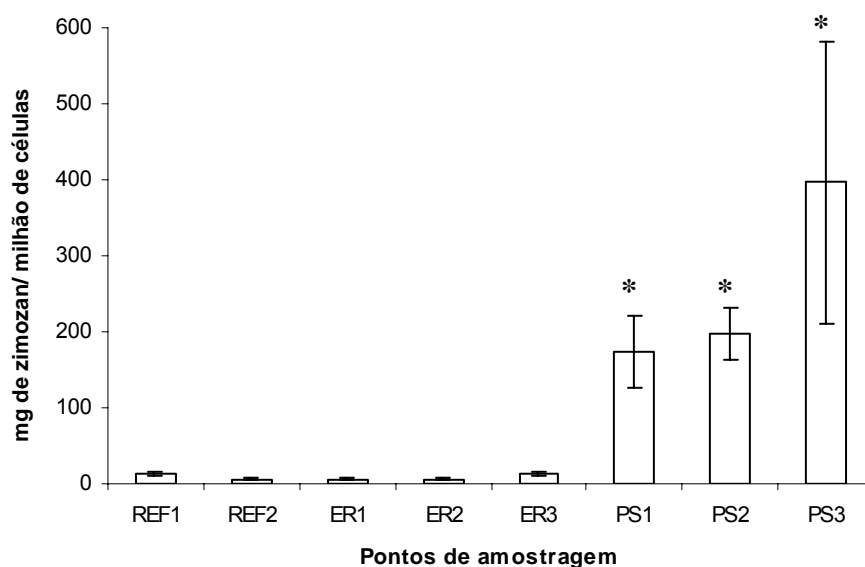


Figura 3. Atividade fagocítica em hemócitos de *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$ $n = 10$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

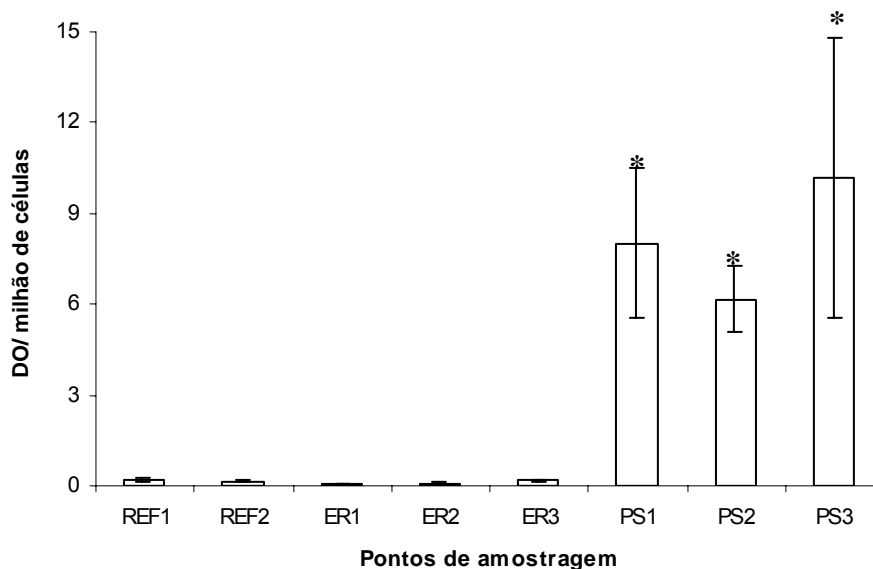


Figura 4. Produção de peróxido de hidrogênio em hemócitos de *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$ $n = 10$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

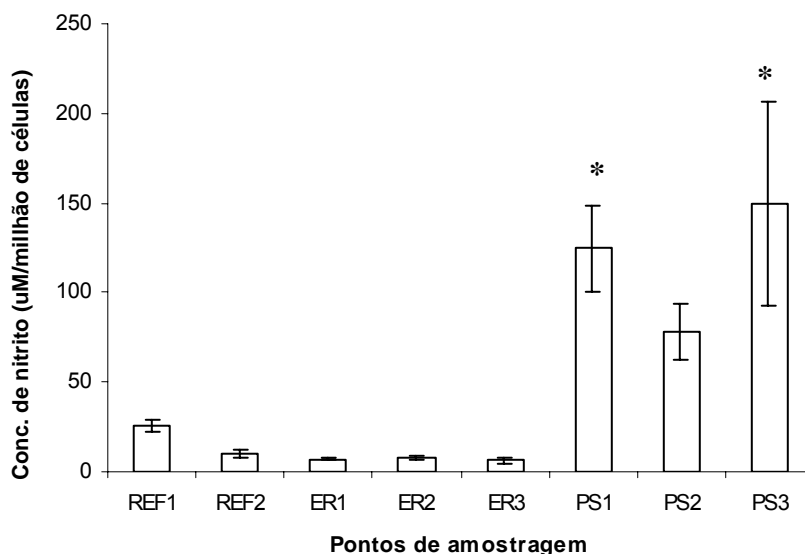


Figura 5. Produção do óxido nítrico em hemócitos de *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$ $n = 10$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

O resultado da atividade da catalase nas glândulas digestivas não apresentou diferença significativa entre as áreas estudadas. Mexilhões coletados nas áreas PS1 and PS2 tiveram uma baixa atividade da catalase se comparado com mexilhões das áreas de REF1 e REF2, mas esta não foi estatisticamente diferente, e animais expostos a essas mesmas áreas (PS1, PS2) apresentaram uma alta produção de peróxido de hidrogênio (Figura 6).

A contagem do número de hemócitos demonstrou que *M. edulis* das áreas PS1, PS2 e PS3 apresentaram uma redução na quantidade de hemócitos em comparação aos das áreas referência (REF1 e REF2) ($P = 0,001$; $F = 84,711$), enquanto que os animais das áreas ER1, ER2 e ER3 apresentaram um aumento no número de hemócitos se comparado com os das áreas referências (REF1 e REF2) ($P = 0,001$; $F = 84,711$) (Figura 7).

Através do desafio bacteriológico foi possível observar que o esgoto tratado e não tratado não afetou a capacidade de eliminar patógenos na espécie estudada (*M. edulis*). Indivíduos das áreas PS1, PS2, PS3, ER1, ER2 e ER3 não apresentaram

nenhuma diferença significativa na capacidade em eliminar *Listonella anguillarum* quando comparado com animais das áreas REF1 e REF2. Além disso, todos os indivíduos infectados com *L. anguillarum* sobreviveram após 24h de infecção (Figura 8).

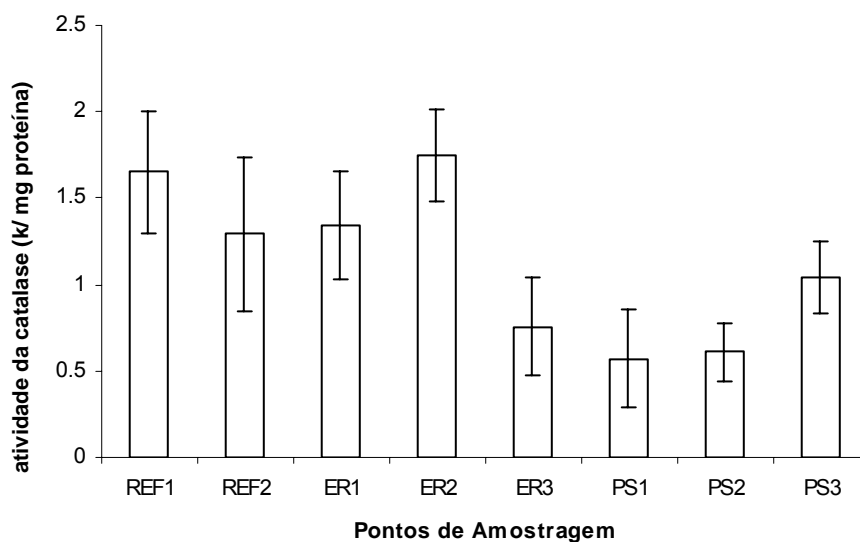


Figura 6. Atividade da enzima catalase em glândula digestiva de *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$ $n = 10$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

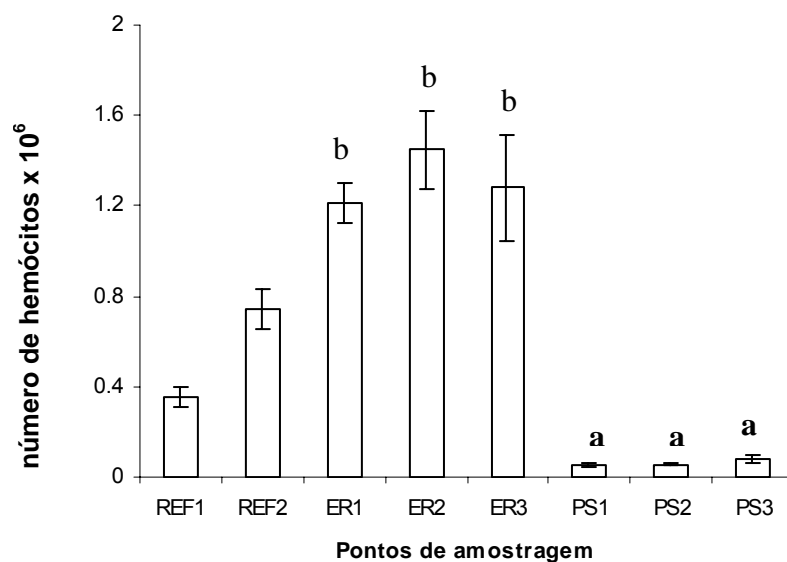


Figura 7. Contagem do número de hemócitos em hemolinfa de *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. a = $P < 0,05$ comparado com REF1 e REF2; b = $P < 0,05$ comparado com REF1 apenas. n= 10 mexilhões/ tratamento \pm SE.

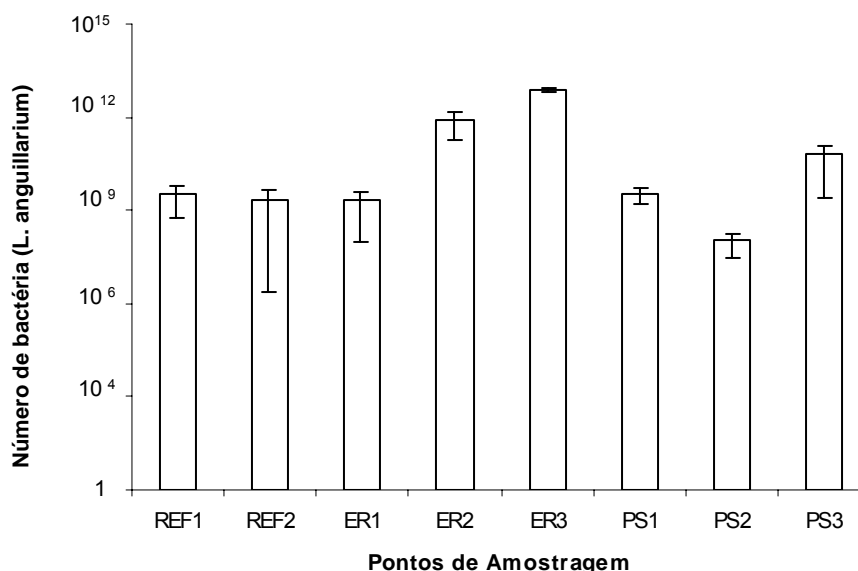


Figura 8. Efeito da pré-exposição (90 dias) às áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) na capacidade de *M. edulis* eliminar bactéria. Desafio Bacteriológico expresso como o número de bactéria (*L. anguillarum*) infectando *M. edulis* após um período de 24h de infecção. * $P < 0,05$ n = 10 mexilhões/tratamento \pm SE.

Através das análises histopatológicas foi possível observar várias lesões em brânquias e glândulas digestivas de *M. edulis* exposto às áreas contaminadas pelo esgoto tratado e não tratado. Estas lesões já foram previamente descritas no Capítulo I, durante o estudo em laboratório. Não foi possível analisar as glândulas digestivas de *M. edulis* da área ER1 devido a mortalidade na mesma.

As brânquias e glândula digestiva dos animais das áreas referências (REF1 e REF2) apresentaram estruturas bem preservadas, tais como: endotélio branquial, sinus hemolinfático nas brânquias e epitélio do túbulo digestivo (Figura 10).

Os números entre parênteses a seguir representam o fator de importância para cada lesão usada para calcular o índice de lesão para cada órgão. As lesões observadas nas brânquias foram: grânulo de lipofuscina (2), dilatação do sinus

hemolinfático (2), hiperplasia (2) e vacuolização (1) do endotélio, infiltração de hemócito (2), endotélio frouxo (3) e fusão lamelar (3). Enquanto que as glândulas digestivas apresentaram citoplasma vacuolizado (1), desorganização do epitélio digestivo (2) e lesão similar a necrose (3) (Figura 10). Algumas lesões observadas neste estudo podem estar envolvidas com respostas imunológicas. Nenhum efeito foi observado na superfície das brânquias através da microscopia eletrônica de varredura e nem mesmo na estrutura dos cílios branquiais.

Nenhum animal da área PS2 apresentou grânulo de lipofuscina, por outro lado 100% dos mexilhões da área referência 1 apresentaram grânulos em suas brânquias ($K = 19,130$; $P = 0,014$) (Tabela 1). O número de grânulos em mexilhões das áreas PS2 e PS3 foi relativamente baixo comparado com os das outras áreas, mas não foi estatisticamente diferente (Figura 9).

A área ER1 apresentou uma alta prevalência de animais com fusão lamelar nas brânquias (40%) comparado com REF1 e REF2 (0%) ($K = 15,170$; $P = 0,05$) (Tabela 1).

Nenhuma diferença estatística foi observada na prevalência de *M. edulis* com alterações histopatológicas nas glândulas digestivas após expostos ao esgoto tratado e não tratado (Tabela 2). No entanto, o índice de lesão para glândula digestiva apresentou diferenças estatisticamente significativas. Animais coletados nas áreas ER2, ER3, PS1, PS2 e PS3 apresentaram um alto índice de lesão para glândulas digestivas se comparado com REF1 ($P = 0,001$; $F = 4,682$), mas nenhuma diferença significativa foi observada no índice de lesão para as brânquias (Figura 11).

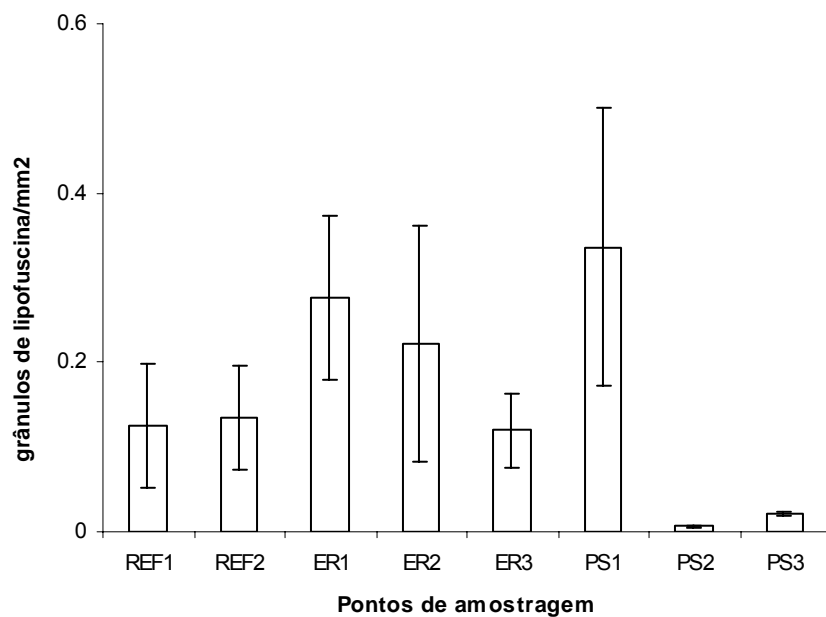


Figura 9. Número de grânulos de lipofuscina por mm^2 no endotélio de brânquias de mexilhões expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$. Barras representam uma média de 5 brânquias/ tratamento \pm SE.

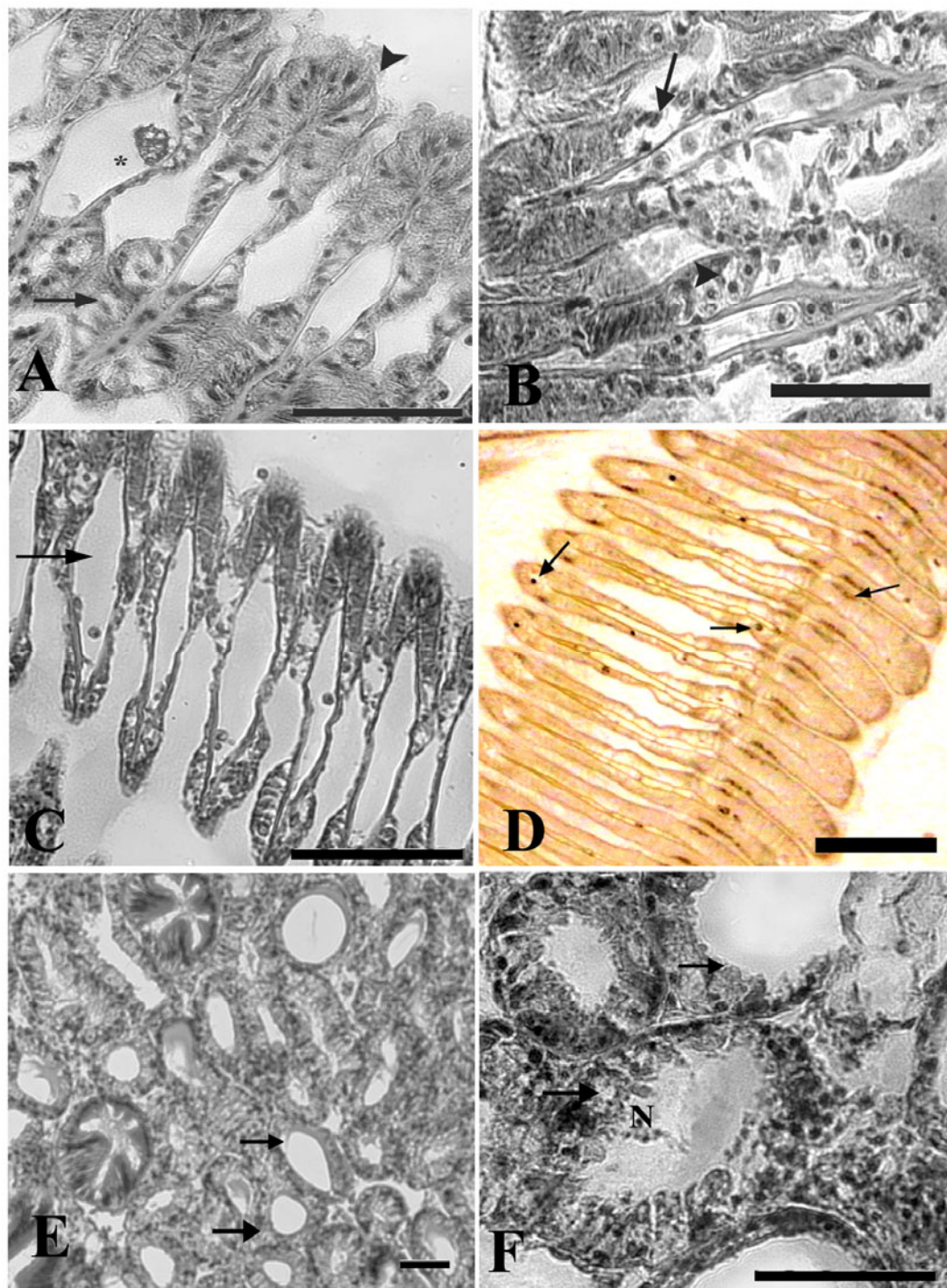


Figura 10. Microscopia de luz de brânquias e glândula digestiva em *M. edulis* expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. Corado com

hematoxilina e eosina, exceto D (corado com Fontana Masson). A – Brânquia (REF1). Observe o sinus hemolinfático (*), células endoteliais (seta), células frontal (cabeça de seta) com cílios. B – Brânquias (ER3). Observe a infiltração de hemócitos (cabeça de seta) no tecido branquial e desorganização do endotélio (seta). C – Brânquias (PS2). Dilatação do sinus hemolinfático (seta). D – Brânquias ER1. Observe os grânulos de lipofusina (seta). E – Glândula digestiva (REF2). Observe os tubulos digestivos (seta). F – Glândula digestiva (ER3). Lesões relacionadas com necrose (seta, N). Barras = 50 μ m.

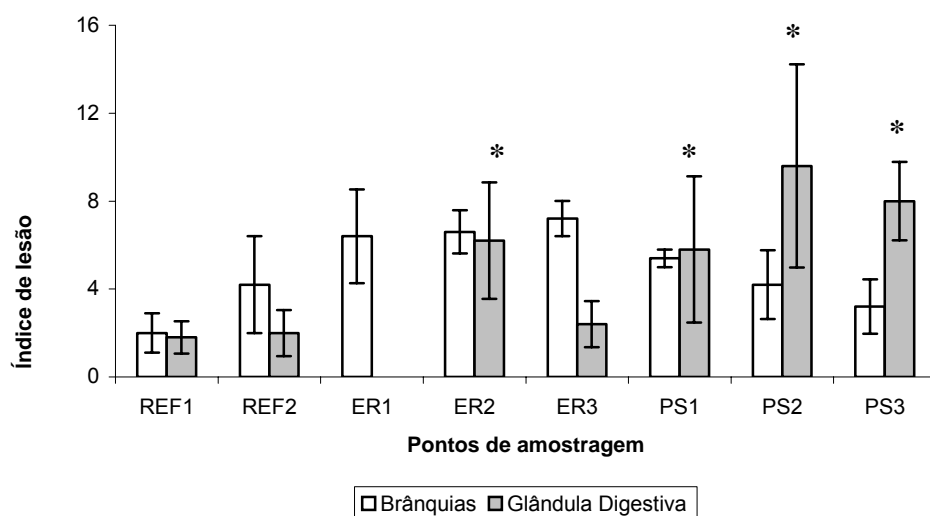


Figura 11. Índice de lesão em brânquias (A) e glândula digestiva (B) de mexilhões expostos a áreas receptoras de esgoto tratado (ER1, ER2, ER3) e não tratado (PS1, PS2, PS3) e áreas de referência (REF1, REF2) durante 90 dias. * $P < 0,05$ $n = 5$ mexilhões/ tratamento \pm SE.

TABELA 1 . PREVALÊNCIA (%) DE *M. edulis* APRESENTANDO LESÕES EM BRÂNQUIAS APÓS 90 DIAS EXPOSTOS *IN SITU* A EFLUENTES DE ESGOTO NÃO TRATADO (PS1, PS2, PS3) E TRATADO (ER1, ER2, ER3) E REFERÊNCIA (REF1, REF2). N=5. NO=NÃO OBSERVADO. * P <0,05.

Lesões	REF1	REF2	ER1	ER2	ER3	PS1	PS2	PS3
Grânulo de lipofuscina	100	25	100	20	60	80	no*	20
Dilatação do sinus hemolinfático	No	no	20	20	20	20	25	40
Hiperplasia do endotélio	No	no	no	no	no	no	25	40
Infusão de hemócitos	25	no	20	20	40	no	no	20
Endotélio frouxo	No	no	no	no	20	no	no	20
Fusão lamelar	No	no	40*	no	no	no	no	no

TABELA 2. PREVALÊNCIA (%) DE *M. edulis* APRESENTANDO LESÕES EM GLÂNDULA DIGESTIVA APÓS 90 DIAS EXPOSTOS *IN SITU* A EFLUENTES DE ESGOTO NÃO TRATADO (PS1, PS2, PS3) E TRATADO (ER1, ER2, ER3) E REFERÊNCIA (REF1, REF2). N=5. NO=NÃO OBSERVADO. * P < 0,05.

Lesões	REF1	REF2	ER1	ER2	ER3	PS1	PS2	PS3
Vacuolização	20	no	no	no	no	25	no	no
Lesão similar a necrose do túbulo digestivo	no	40	50	no	66,6	50	40	20
Desorganização do epitélio dos túbulos	no	40	50	no	no	no	no	no

5. DISCUSSÃO

O estudo deste capítulo forneceu novos dados sobre os efeitos tóxicos causados pelo esgoto tratado e não tratado em *Mytilus edulis* expostos às áreas estuarinas receptoras de esgoto doméstico, além de contribuir com informações para futuros estudos de monitoramento dos efeitos do esgoto no ambiente aquático. Estudos em áreas receptoras de esgoto também são essenciais para entender a interação entre poluentes e fatores ambientais.

A mortalidade observada durante este estudo pode estar relacionada com as taxas de oxigênio dissolvido em todas as áreas estudadas. Provavelmente, a concentração de oxigênio dissolvido na água não é a causadora da alta mortalidade em algumas áreas, mas pode ser um contribuinte para o aumento da mesma.

Os parâmetros imunológicos e histopatológicos medidos aqui apresentaram variações entre as áreas estudadas, sugerindo que estes parâmetros são sensíveis indicadores de qualidade da água.

Os ensaios imunológicos demonstraram que a atividade fagocítica e a produção de peróxido de hidrogênio estão sendo moduladas positivamente em *Mytilus edulis*. Esta resposta pode ser devido a variedade e a interação de poluentes presentes no ambiente e/ou ao longo período de exposição às baixas concentrações de esgoto doméstico não tratado.

O resultado da produção de óxido nítrico, H_2O_2 e fagocitose demonstrou que o esgoto não tratado (PS1, PS2, PS3) modulou o sistema imunológico de *M. edulis* exposto por 90 dias às áreas receptoras do esgoto. CHENG e SULLIVAN (1984) reportaram que *Crassostrea gigas* expostas ao cobre e ao ferro apresentaram alta taxa de fagocitose quando comparados ao grupo controle. ST-JEAN et al. (2002b) também observou um aumento na atividade fagocítica em *M. edulis* expostos ao TBT (tributil-estanho) e DBT (di-butil-estanho) em laboratório. Por outro lado, efluentes de indústria de papel e metais, tais como cádmio, mercúrio e zinco inibiram fagocitose em bivalves marinhos e de água doce (SAUVÉ et al., 2002; ST-JEAN et al., 2003). Através desses

estudos é possível observar que a curva de resposta para a fagocitose não é linear, mas sim dependente da concentração e do tempo de exposição ao poluente.

Dentro das células, o processo de fagocitose é seguido pela produção de peróxido de hidrogênio. Mas, vale ressaltar que essa produção pode ser realizada por outras vias biológicas e não somente a fagocitose. De acordo com este estudo, a produção de peróxido de hidrogênio demonstrou ser mais alta em indivíduos expostos às áreas que recebem esgoto não tratado. Adicionalmente, a baixa atividade da catalase nas glândulas digestivas dos animais expostos às áreas que recebem esgoto não tratado é um indicativo para o alto nível de H_2O_2 na hemolinfa dos indivíduos coletados nessas áreas. No entanto, esta enzima não pode ser considerada a única explicação para a alta produção desta molécula, além disso, a atividade da catalase não foi estatisticamente diferente entre as áreas estudadas, o que torna difícil defender essa hipótese. A atividade da catalase vem sendo considerada um biomarcador de contaminação importante, mas alguns estudos demonstraram que essa enzima pode ser influenciada também pela variação da temperatura, salinidade e luz (POWER e SHEEHAN, 1996; KHESSIBA et al., 2005), podendo interferir na interpretação dos dados, especialmente em estudos de campo. A alta produção de H_2O_2 pode causar danos às células, tais como alteração do balanço redox, inativação de enzimas, degradação de proteínas, peroxidação de lipídio, danos no DNA e até morte celular (LIVINGSTONE et al., 1990). O aumento no nível de H_2O_2 nas células observado neste trabalho também foi descrito por COLES et al. (1994) em *Mytilus edulis* exposto a fluoranteno (HPA) e também observado nos indivíduos expostos ao esgoto não tratado (100%) durante 21 dias de exposição em laboratório (Capítulo I).

A eliminação de bactérias pelos hemócitos ocorre através de alguns processos, entre eles está a fagocitose e a produção de óxido nítrico. O óxido nítrico em associação com radical superóxido forma peroxinitrito, o qual é considerado uma molécula bactericida (FRANCHINI et al., 1995). Os animais expostos às áreas que recebem esgoto não tratado apresentaram uma alta produção de óxido nítrico, provavelmente devido à presença de bactérias no esgoto não tratado. Os mexilhões expostos às áreas que recebem esgoto tratado não apresentaram alta produção de

óxido nítrico e isto pode ser explicado pelo fato de que a maioria dos microrganismos foram eliminados previamente durante o processo de cloração e de decloração na estação de tratamento de esgoto. A produção de óxido nítrico apresentou uma curva de resposta similar à observada para fagocitose, onde uma alta produção de óxido nítrico é observada durante longo períodos de exposição à baixas concentrações de esgoto no ambiente e uma baixa produção é observada nos mexilhões estudados, após exposição à 100% de esgoto não tratado por um curto período de tempo em laboratório (Capítulo I).

A contagem de hemócitos mostrou que os animais das áreas ER1, ER2 e ER3 apresentaram um aumento no número de hemócitos na hemolinfa, e os mexilhões das áreas PS1, PS2 e PS3 tiveram uma diminuição no número de hemócitos. Alguns estudos já demonstraram que o número de hemócitos em mexilhões podem flutuar dependendo da concentração e tempo de exposição aos poluentes (COLES et al., 1994; PIPE e COLES, 1995; ST- JEAN et al., 2002(a,b); MAYRAND et al., 2005). PIPE e COLES (1995) observaram que o número de hemócitos em bivalves variou dependendo das concentrações de lindane, DDT e PCBs testados. SURESH e MOHANDAS (1990) demonstraram uma redução no número de hemócitos em bivalves após exposição ao cobre. Além disso, ST-JEAN et al. (2002) observaram que *M. edulis* expostos ao TBT apresentaram um baixo número de hemócitos após 32 dias de exposição.

O alto número de hemócitos nos indivíduos expostos às áreas que recebem esgoto tratado é um indicativo de resposta imunológica; quando os animais estão sob condições de estresse, uma das repostas básicas é o aumento no número de células. No entanto, o baixo número de hemócitos em *M. edulis* das áreas que recebem esgoto não tratado sugere que o sistema imunológico esteja deprimido e possivelmente não é capaz de responder eficientemente contra patógenos e/ou substâncias químicas. A alta produção H_2O_2 e óxido nítrico assim como a fagocitose podem ter sido as opções encontradas pelos mexilhões para compensar o baixo número de hemócitos agindo contra os danos provocados pelos poluentes a que estiveram expostos.

As análises de prevalência de *M. edulis* com lesões histopatológicas demonstraram que um alto número de indivíduos apresentaram lesões nas brânquias, mas o índice de lesão aplicado demonstrou que as glândulas digestivas dos animais apresentaram mais lesões em seu tecido do que nas brânquias, o que pode ser explicado pela exposição crônica a baixas concentrações. Os tipos de lesões encontrados nas brânquias e nas glândulas digestivas neste estudo foram similares às observadas durante experimento em laboratório. A presença de grânulos de lipofuscina, dilatação do sinus hemolinfático e infiltração de hemócitos nas brânquias estão relacionadas com respostas imunológicas em tecidos, mas os grânulos de lipofuscina foram a única alteração estatisticamente significativa entre as áreas estudadas.

Os grânulos de lipofuscina têm sido utilizados como biomarcador de estresse celular em associação com alterações lisossomais em glândulas digestivas de bivalves (AU, 2004; MOORE et al., 2005; DONDERO et al., 2006; NIGRO et al., 2006; ZORITA et al., 2006). No entanto, no presente estudo, assim como no estudo de bioensaios (Cap.I), os grânulos de lipofuscina foram encontrados mais nas brânquias que nas glândulas digestivas, como prevê outros trabalhos com outras espécies.

O presente estudo demonstrou que *M. edulis* expostos às áreas que recebem esgoto não tratado apresentaram o menor número de grânulos, mas não foi observada nenhuma diferença significativa. DONDERO et al. (2006) desenvolveu um estudo onde bivalves foram expostos a 3 gradientes de concentração de cobre por 18 dias, e foi observado que a glândula digestiva de indivíduos de duas áreas de estudo (dois gradientes à jusante da fonte de contaminação de cobre - mina) apresentaram alta quantidade de grânulos de lipofuscina comparado com mexilhões expostos diretamente ao efluente da mina de cobre. ZORITA et al. (2006) também observou que *M. edulis* expostos por 3 semanas a efluentes de mina de cobre apresentaram um baixo número de grânulos de lipofuscina comparado com indivíduos coletados à jusante da mina. Ambos os estudos reportaram resultados similares ao presente trabalho e ao estudo em laboratório (Cap.I), ou seja, os animais expostos diretamente ao efluente apresentaram menos grânulos que os animais expostos à jusante ou à montante da fonte de contaminação. A mesma hipótese apresentada para explicar o baixo número de

grânulos de lipofuscina nos *M. edulis* expostos a 100% de esgoto não tratado em laboratório (Cap I), pode ser aplicada para explicar o resultado deste estudo em campo. Este princípio diz que exocitose dos lisossomos contendo xenobióticos e lipofuscina pode ser um possível processo de detoxificação (CAJARAVILLE et al., 1995; CANCIO et al., 1995; ZORITA et al., 2006), mas assim como no estudo em laboratório, esta hipótese não pôde ser confirmada, uma vez que a exocitose de lisossomos não fez parte das análises neste trabalho.

A fusão lamelar também foi observada em um número significativo de indivíduos expostos as áreas receptoras de esgoto tratado. Esta fusão pode ser um erro durante a regeneração do epitélio branquial. SUNILA (1986) também observou fusão lamelar em *M. edulis* expostos ao cádmio, mas não existe informação sobre a fusão lamelar em brânquias de organismos expostos ao esgoto.

As análises de prevalência de *M. edulis* com lesões nas glândulas digestivas não apresentaram nenhuma diferença estatística, mas o índice de lesão mostrou que os mexilhões localizados em PS1, PS2 e PS3 e ER2 apresentaram um índice de lesão maior para a glândula digestiva. As lesões observadas nas glândulas digestivas variaram entre reversível, moderada e irreversível. A presença de áreas similares a áreas necróticas neste tecido pode estar associada com estresse oxidativo, uma vez que a necrose está fortemente ligada a esse processo (LI et al., 2000). Além disso já é descrito pela literatura que alguns poluentes presentes no esgoto, tais como metais, pesticidas e HPA estão associados com o aumento de radicais citotóxico nas células (PIPE e COLES, 1995; GAGNÉ et al., 2002). Estas formas oxidativas podem aumentar as áreas de necrose e perturbar as homeostase celular (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005).

Algumas das alterações histopatológicas observadas neste estudo podem ser irreversíveis e podem causar danos funcionais e estruturais, os quais podem levar as sérias conseqüências para os organismos. As outras lesões também observadas nas glândulas foram a vacuolização celular e a desorganização do epitélio digestivo. O citoplasma vacuolizado pode estar relacionado com o acúmulo de lipídios, o qual pode

ser um estoque fisiológico normal nas células, mas também pode ser um mecanismo de defesa contra contaminantes lipossolúveis (BLAGIANTI – RISBOURG et al., 1997).

As análises histopatológica e imunológica demonstraram que *M. edulis* estão sofrendo as influências do esgoto tratado e não tratado, mas este resultado levanta uma questão: A influência dos contaminantes presentes no esgoto está afetando os mexilhões ao ponto de interferir na capacidade desses organismos em eliminar patógenos? A mesma pergunta foi considerada durante o experimento em laboratório, e como resposta: foi observado que os indivíduos expostos às altas concentrações de esgoto não tratado (50% e 100%) tiveram sua capacidade em eliminar patógenos afetada, resultando até mesmo na morte de 100% dos organismos após 24h infectados com o patógeno (Cap. I). No presente estudo, a mesma pergunta recebeu uma resposta diferente da observada no estudo em laboratório. Os indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto tratado e não tratado por 90 dias não apresentaram nenhuma diferença significativa na capacidade em eliminar bactéria. MAYRAND et al. (2005) e ST – JEAN et al. (2002 b e 2003) utilizaram o desafio bacteriológico como uma ferramenta para medir a toxicidade de vários contaminantes em *Mytilus edulis* e também enfatizaram a importância de relacionar a modulação do sistema imune com a capacidade de defesa contra patógenos. Neste estudo, o sistema imune do *M. edulis* demonstrou estar sendo influenciado pelo esgoto não tratado, mas não ao nível em que os mexilhões tornam-se incapazes de se defenderem contra patógenos.

As respostas imunológicas observadas neste estudo sugere que a fagocitose e moléculas citoplasmáticas estão participando essencialmente no processo de eliminação das bactérias. Mesmo sem efeitos negativos no sistema imune e na capacidade em eliminar bactéria, é importante considerar algumas das alterações histopatológicas, as quais podem estar debilitando a vida dos mexilhões no estuário de Pictou.

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os gradientes de diluição para o Porto de Pictou (PS1, PS2 e PS3) e o rio Leste (ER1, ER2, ER3) com relação às respostas imunológicas, bioquímicas e morfológicas. Este resultado pode estar relacionado com a ação de fatores ambientais, tais como: as mudanças de marés,

diferenças de salinidade, temperatura e oxigênio dissolvido. No entanto, diferenças significativas foram observadas nas respostas imunes e histopatologia entre indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto não tratado e ao esgoto tratado, demonstrando que existem diferenças nos níveis de toxicidade entre esgoto despejados no ambiente sem tratamento prévio e tratado. Finalizando, acredita-se que essas diferenças sejam devidas não somente ao próprio esgoto (tratado ou não), mas também aos fatores abióticos das áreas estudadas.

6. CONCLUSÃO

Os biomarcadores imunológicos e histopatológicos demonstraram serem sensíveis na detecção dos efeitos tóxicos do esgoto na espécie *M. edulis*. A resposta de três importantes mecanismos de defesa (fagocitose, produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico) demonstrou que o esgoto não tratado pode modular o sistema imune de *M. edulis* quando comparados com animais das áreas de referência.

Os resultados mostram que o esgoto não tratado afeta o sistema imune do *M. edulis*, mas o mesmo não é observado para os indivíduos expostos ao esgoto tratado. Apesar desses dois tipos de esgoto se originarem de cidade diferentes (Pictou e New Glasgow) podemos sugerir que talvez o processo de tratamento do esgoto possa estar ajudando a diminuir a toxicidade do esgoto no ambiente aquático, mas mesmo assim, muitos aspectos desse processo devem ser aperfeiçoados, principalmente para reduzir a quantidade de substâncias químicas despejadas no ambiente. No entanto, existem outros fatores, tais como a diluição no ambiente receptor, quantidade de efluente despejado, qualidade da água no ambiente receptor, salinidade, oxigênio dissolvido e outros contaminantes que também podem estar interferindo na toxicidade do esgoto no ambiente.

Finalmente, o esgoto não tratado demonstrou afetar o sistema imune dos mexilhões estudados, mas estes efeitos não foram refletidos na capacidade dos mesmos em eliminar bactérias, mas ambos os esgoto tratado e não tratado causaram alterações histopatológicas em indivíduos da espécie *M. edulis*.

DISCUSSÃO GERAL

O despejo indiscriminado do esgoto em ambiente aquático, assim como as ocasionais inundações pluviais, transbordamento de esgoto em estações de tratamento e/ou falhas durante o processo de tratamento são questões preocupantes, especialmente quando consideramos o aumento da população no mundo anualmente, a necessidade de água potável, assim como a restrição de informações sobre a interferência do esgoto na qualidade das águas em rios, lagos, estuários e oceanos.

Os estudos em laboratório são importantes e eficientes para entender os mecanismos de ação dos poluentes, assim como visualizar sob condições controladas os piores “cenários” possíveis causados pelos poluentes. Por outro lado, os estudos *in situ* são cruciais para determinar as condições e efeitos de contaminantes em um ecossistema aquático. Ambos os experimentos, laboratório e *in situ*, podem fornecer melhor conhecimento sobre a relação entre contaminantes, fatores ambientais e organismos. De uma forma geral, este estudo demonstrou que através do bioensaio foi possível observar os efeitos diretamente relacionados com os contaminantes presentes no esgoto bruto (ou não tratado), enquanto que o estudo *in situ* possibilitou observar os efeitos tóxicos causados pelo esgoto em associação com os fatores ambientais. Ambos são de grande importância para um melhor entendimento da ação tóxica do esgoto no bivalve marinho *M. edulis*.

Além disso, o estudo de bioensaio em laboratório foi importante para a padronização e calibração de alguns métodos imunológicos, bioquímicos e histopatológicos e também para a obtenção de resultados sobre os efeitos do esgoto não tratado (em diferentes concentrações) sob condições controladas. Já o estudo *in situ* demonstrou os efeitos tóxicos do esgoto sob a influência das variáveis ambientais em um ecossistema aquático afetado cronicamente por este tipo de despejo.

Os ensaios imunológicos em ambos os estudos, demonstraram diferenças no nível de resposta para algumas análises quando comparando os estudos de laboratório e campo. A atividade fagocítica e a produção de peróxido de hidrogênio sugerem que o sistema imune de *M. edulis* no estudo *in situ* foi mais positivamente modulado pelo

esgoto não tratado do que os dos indivíduos expostos ao esgoto não tratado no experimento em laboratório (Capítulo I).

Em ambos estudos, foi possível identificar a atividade fagocítica como uma das ferramentas mais sensíveis para detectar a toxicidade do esgoto em bivalves marinhos. A medida da fagocitose apresentou resultados estáveis tanto no estudo em laboratório quanto no *in situ*, mas ainda é necessária a realização de mais estudos e testes para se padronizar as respostas dessa atividade biológica de acordo com as concentrações e tempo de exposição do esgoto e/ou outros contaminantes.

Sabe-se, através do experimento em laboratório apresentado no Cap I e campo apresentado no Cap II, que a curva de resposta para a fagocitose não é linear, mas sim dependente da concentração e do tempo de exposição ao poluente. Essa diferença de resposta foi observada nos indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto não tratado. Estes apresentaram uma alta fagocitose comparada com os mexilhões das áreas de referência após 90 dias, enquanto que os animais expostos à 100% esgoto não tratado em laboratório, apresentaram uma inibição na atividade da fagocitose em 21 dias de exposição. Este exemplo demonstra que a exposição por um longo período de tempo às baixas concentrações de esgoto não tratado pode aumentar a fagocitose, enquanto que a exposição às altas concentrações de esgoto não tratado por um curto período de tempo pode diminuir esta atividade. Experimentos em laboratório mostram que a fagocitose em moluscos pode ser aumentada após exposição por um curto período e baixas concentrações de contaminantes (ANDERSON, 1981; CHENG e SULLIVAN, 1984), mas tende a diminuir na presença de altas concentrações de contaminantes ou longo período de exposição (FRIES e TRIPP, 1980; ANDERSON, 1981). Assim como no presente estudo, a fagocitose também demonstrou ser um biomarcador sensível para detecção da toxicidade do esgoto em peixe e bivalves.

A produção do peróxido de hidrogênio foi positivamente modulada no estudo em laboratório (Cap. I), assim como em campo (Cap. II), mas a quantidade de H_2O_2 produzida por hemócitos de *M. edulis* exposto ao esgoto *in situ* foi consideravelmente mais alta. O aumento da produção em ambos os estudos demonstram que os compostos e microrganismos presentes no esgoto podem estimular a produção dessa

molécula oxidante. Essa produção é o resultado de uma via metabólica (queima respiratória ou oxidativa), ativada através do processo de fagocitose (PIPE, 1992). O aumento da produção pode ser devido à interferência de contaminantes em vários processos celulares, entre eles: degradação do H_2O_2 através da enzima catalase, ativação da P-450, inibição da glutathione-S-transferase e produção do H_2O_2 nos peroxisossomos, mas devido à complexidade da composição do esgoto, torna-se difícil determinar o mecanismo de ação dos contaminantes presentes no esgoto para a elevada produção de H_2O_2 .

A concentração de óxido nítrico foi elevada em indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto não tratado por 90 dias, e diminuiu em mexilhões expostos às altas concentrações do esgoto não tratado (50% e 100%) durante 21 dias. Esta indução da produção do óxido nítrico em *M. edulis* demonstrou estar relacionada com o tempo de exposição e a concentração dos contaminantes. Animais expostos às altas concentrações de esgoto por um curto período de tempo apresentam inibição da produção, enquanto mexilhões expostos a concentrações menores (mais diluídas no ambiente) por um longo período de tempo apresentam uma elevação na produção de óxido nítrico.

A medida da produção do óxido nítrico pode ser uma ferramenta interessante para estudos relacionados com toxicidade do esgoto, já que o esgoto pode apresentar uma alta diversidade de bactérias e outros microrganismos patogênicos. Apenas recentemente é que o óxido nítrico começou a ser utilizado como um biomarcador em peixes bivalves. OTTAVIANI et al. (1993) demonstrou que os hemócitos de *M. edulis* podem produzir óxido nítrico e esta molécula pode atuar como bactericida em mexilhões. Não existe muita informação sobre a influência de poluentes nos mecanismos regulatórios da produção de óxido nítrico pelas células. É difícil dizer como a óxido nítrico sintase está sendo afetada, especialmente em bivalves, uma vez que há muito pouca informação sobre a regulação da óxido nítrico sintase em bivalves disponível na literatura (ARUMUGAN et al., 2000). SMITH et al. (2000) tenta explicar a ativação e inibição da óxido nítrico sintase com uma hipótese onde baixas concentrações de contaminantes podem induzir a óxido nítrico sintase através do

desencadeamento de processos inflamatórios ou estresse, enquanto que altas concentrações estariam inibindo a enzima direta ou indiretamente.

O número de hemócitos na hemolinfa diminuiu após exposição a altas concentrações de esgoto em laboratório e a áreas receptoras de esgoto não tratado em campo. Como já discutido nos dois capítulos essa diminuição pode ser devida aos contaminantes, uma vez que vários estudos demonstram que o número de hemócitos em mexilhões podem variar dependendo da concentração e tempo de exposição aos poluentes (COLES et al., 1994; PIPE e COLES, 1995; ST- JEAN et al., 2002(a,b); MAYRAND et al., 2005).

A histopatologia é uma ferramenta que vem sendo utilizada de forma cada vez mais freqüente nos estudos de toxicologia, uma vez que ela pode determinar os efeitos tóxicos causados por agentes estressores em nível de organismo, representando uma integração cumulativa de efeitos fisiológicos e bioquímicos (MYERS e FOURNIE, 2002).

Biomarcadores histopatológicos são definidos como lesões em células e/ou tecidos que sinalizam efeitos de exposição de organismos à contaminantes (HINTON et al., 1992). Recentemente, cientistas reforçaram os métodos de histopatologia em estudos de toxicologia, através da criação de índices de lesões, os quais ajudam a comparar resultados e a produzir uma base de dados para detectar efeitos sub-letais especialmente em peixes (MYERS e FOURNIE, 2002; BERNET et al., 1999). Não existem muitos estudos utilizando a histopatologia como um biomarcador para detectar os efeitos tóxicos do esgoto em peixe e/ou bivalves. O número de estudos relacionando tecidos e órgãos de bivalves e efeitos do esgoto é bastante restrito. No entanto, o presente estudo traz novos dados sobre os efeitos do esgoto (especialmente não tratado) nas estruturas de órgãos fundamentais como as brânquias e as glândulas digestivas. A integração das medidas imunológicas e bioquímicas com as alterações em tecidos proporcionou uma melhor visão da atuação do esgoto no organismo como um todo, e muitas das lesões observadas são indicativos de respostas imunológicas nos mexilhões tanto no bioensaio como no estudo *in situ*.

O desafio bacteriológico pode ser considerado um teste importante principalmente para relacionar os efeitos fisiológicos com a capacidade do animal lidar com infecções

e/ou patógenos presentes no ambiente. Neste estudo, foi observada uma diminuição na sobrevivência dos animais pré-expostos a 50% e 100% esgoto não tratados infectados pela bactéria *L. anguillarum* durante um período de 24 h. Essa diferença na eliminação e sobrevivência dos animais após infectados pela *L. anguillarum* não foi observada nos grupos pré- expostos às áreas receptoras de esgoto tratado e bruto no estudo *in situ*. O resultado do estudo *in situ* demonstra que o desafio bacteriológico não apresenta um grau de sensibilidade reduzido, e isto pode ser devido à sensibilidade dos animais a espécie de bactéria utilizada. Isto também levanta outras questões: será que os mexilhões após expostos ao esgoto responderiam da mesma maneira se infectados com bactérias mais comuns encontrados no ambiente aquático, como por exemplo, *E. coli*? Assim como outras espécies, *M. edulis* também apresenta sensibilidade variável dependendo do tipo de patógeno a que são expostos, mas de uma forma geral, as condições fisiológicas dos organismos parasitados/infectados, assim como a quantidade de patógenos no ambiente são fatores importantes para entender como seria a resposta de *M. edulis* quando infectados com bactérias mais comuns do ambiente aquático. Neste estudo, acredita-se que o desafio bacteriológico teve um papel importante na integração das respostas fisiológicas com respostas de maior relevância ecológica.

Todos os métodos utilizados neste estudo no hemisfério Norte podem ser utilizados em estudos futuros no Brasil. As técnicas utilizadas são de fácil realização, não apresentam um custo elevado e podem ser ótimas ferramentas para o estudo dos efeitos do esgoto doméstico na águas brasileiras.

Este estudo, além de colaborar com algumas informações sobre os efeitos tóxicos causados pelo esgoto no sistema imune e tecidos dos mexilhões, também levantou várias questões que poderão ser respondidas em futuros trabalhos, dentre elas: (1) como seria a resposta imune dos mexilhões se expostos ao esgoto tratado (primário, secundário) em laboratório? (2) como e quanto os outros fatores existentes no ambiente (diluição do efluente, quantidade de efluente despejado, qualidade da água no ambiente receptor e outros contaminantes) estariam influenciando na ação tóxica do esgoto durante as exposições *in situ*? (3) quais outros potenciais biomarcadores

poderiam contribuir para detectar a toxicidade do esgoto? (4) como caracterizar quimicamente o esgoto? Todas essas questões abrem uma variedade de perspectivas para novos estudos.

Finalizando, o presente trabalho mostrou que a fagocitose foi o melhor método utilizado para medir a toxicidade do esgoto, mas, ainda precisa ser melhor padronizado. Apesar dos biomarcadores utilizados apresentarem uma menor especificidade, estes possibilitaram uma interação de aspectos celulares, fisiológicos e teciduais. Além disso, todos esses aspectos foram relacionados com a capacidade dos animais eliminarem bactérias através do desafio bacteriológico. E, os estudos de laboratório quando associados com dados obtidos em campo, permitiram uma compreensão mais realística do que pode está ocorrendo no ambiente natural. Isto facilita a aplicação dos dados científicos em favor da sociedade e podem tornar-se um argumento importante para algumas tomadas de decisões, principalmente as de caráter político e social.

CONCLUSÕES GERAIS

Este estudo revelou os efeitos tóxicos do esgoto (especialmente não tratado) na espécie *Mytilus edulis* através do uso de uma seleção de parâmetros imunológicos, bioquímicos e histopatológicos durante a exposição em laboratório e campo.

Através do uso de bioensaios, observou-se que os efeitos mais relevantes nos mexilhões expostos foi nas mais altas concentrações em um período de exposição relativamente curto (21 dias). Além disso, estas concentrações afetaram a capacidade dos mexilhões em eliminar patógenos, observado através da diminuição da resistência a doença após 24 h de infecção bacteriana.

Apesar do estudo em laboratório ter demonstrado que o esgoto não tratado pode modular as respostas imunológicas, causar lesões em brânquias e glândulas digestivas e diminuir a resistência a doença em *M. edulis* expostos por 21 dias, estes resultados não podem ser diretamente extrapolados para o ambiente ou para uma população natural dessa espécie estudada, devido ao fato dos ensaios em laboratório não serem 100% representativos do ambiente natural. Mas, os resultados do bioensaio puderam ser utilizados como uma base de informações para o estudo de campo, mostrando os prováveis efeitos tóxicos causados pelo esgoto não tratado em *M. edulis*.

Já os estudos em campo mostraram que o esgoto não tratado diluído no ambiente receptor modulou positivamente o sistema imune do *M. edulis* comparado com os indivíduos expostos nas áreas referência. Mas, esta modulação não foi, no entanto observada nos indivíduos expostos às áreas receptoras de esgoto tratado, sugerindo que o tratamento do esgoto está sendo eficiente na diminuição da toxicidade do mesmo para a espécie em estudo.

Apesar dos atuais tratamentos de esgoto não se mostrarem ainda eficientes para eliminar contaminantes tais como desreguladores endócrinos, produtos farmacêuticos e de uso pessoal, os atuais tratamentos parecem estar beneficiando o ambiente baseado nas análises dos parâmetros medidos em campo. Além do sistema de tratamento, outros fatores ambientais também podem estar contribuindo para a potencialização e/ou diluição dos efeitos tóxicos do esgoto na biota aquática.

Apesar dos indivíduos expostos ao esgoto (50% e 100% não tratado) em laboratório terem apresentado uma significativa diminuição na sobrevivência dos animais infectados com *L. anguillarum*, o mesmo não foi observado para os indivíduos expostos nas áreas receptoras de esgoto tratado e não tratado durante o estudo *in situ*. Esses resultados pode ser explicado pela existência de outros fatores inerente ao estudo de campo como: diluição no ambiente receptor, variação da quantidade despejada e as condições físico-químicas do ambiente.

Entre os testes analisados no estudo de bioensaio e campo, conclui-se que a atividade da fagocitose foi o método mais estável neste estudo, mas ainda existe a necessidade de padronização da metodologia. Além disso, este estudo demonstrou a importância do uso de testes simultâneos em laboratório e em campo, uma vez que podem complementar-se com diferentes informações sobre os efeitos tóxicos de poluentes e a importância das interações com o ambiente na determinação da toxicidade real.

Considerando as interferências dos fatores ambientais, os métodos utilizados e aplicados em laboratório e em campo no presente estudo podem ser empregados em estudos de biomonitoramento, aumentando as informações necessárias para o controle do impacto do esgoto urbano nas regiões estuarinas.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. **Molecular biology of the cell.** 4th Edition, Garland Science, New York, 2002.

ALEXANDER, R. M. **The invertebrates.** Cambridge University press, Cambridge p. 297-298, 1979.

ALLANSON, B. R.; BAIRD, D. **Estuarines of South Africa.** Cambridge University press, Cambridge, 1999.

ALONSO, M.C., TIRAPU, L., GINEBRED, A., BARCELÓ, D. Monitoring and toxicity of sulfonated derivatives of benzene and naphthalene in municipal sewage treatment plants. **Environm. Pollut.** v. 137, p. 253-262, 2005.

ANDERSON, R. S., GIAM, C. S., RAY, L. E., TRIPP, M. R. Effects of environmental pollutants on immunological competency of the clam *Mercenaria mercenaria*: Impaired bacterial clearance. **Aquat. Toxicol.** v. 1, p. 187-195, 1981.

ANDERSON, D. P.. Immunological indicators: effects of environmental stress on immune protection and disease outbreak. **Amer. Fish. Soc. Symp.** v. 8, p. 38-50, 1990.

ARUMUGAM, M., ROMESTAND, B., TORREILLES, J., ROCH, P. In vitro production of superoxide and nitric oxide (as nitrite and nitrate) by *Mytilus galloprovincialis* haemocytes upon incubation with PMA or laminarin or during yeast phagocytosis. **Europ. J. of Cell Biol.** v. 79, p. 513-519, 2000.

AU, D. W. T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Mar. Poll. Bull.** v. 48, p. 817-834, 2004.

AUFFRET, M. Histopathological changes related to chemical contamination in *Mytilus edulis* from field and experimental conditions. **Mar. Eco. Prog. Ser.** v. 46, p. 101-107, 1988.

BERNET, D., SCHMIDT, H., MEIER, W., BURKHARDT-HOLM, P., WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **J. Fish. Dis.** v. 22, p. 25-34, 1999.

BIAGIANTI-RISBOURG, S., PAIRAULT, C., VENET, G., BOULEKBACHE, H. Effect of lindane on the ultrastructure of the liver of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes. **Toxicology.** v. 145, p. 203-215, 1997.

BOYD, G. R., REEMTSMA, H., GRIMM, D. A., MITRA, S. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. **The Science of the Total Environment** v 311 p 135-149, 2003.

CAJARAVILLE, M. P., ROBLEDO, Y., ETXEBERRIA, M., MARIGÓMEZ, I. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution: molluscan digestive lysosomes. In: Cajaraville, M. P. (Ed.), **Cell biology in Environmental Toxicology**. University of the Basque Country Press Service, Bilbao p. 29-55, 1995.

CANCIO, I., GWYNN, I. A., IRELAND, M. P., CAJARAVILLE, M. P. The effects of sublethal lead exposure on ultrastructure and on the distribution of acid phosphatase activity in chloragocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta). **Histochem. J.** v. 27, p. 965-973, 1995.

CHENG, T. C., SULLIVAN, J. T. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. **Mar. Environ. Res.** v. 14, p. 305-315, 1984.

COHEN, G., KIM, M., OGWU, V. A modified catalase assay suitable for a plate reader and for the analysis of brain cell cultures. **J. of Neuro. Metho.** v. 67, p. 53-56, 1996.

COLES, J. A., FAIRLY, S.R., PIPE, R. K. The effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel *Mytilus edulis*. **J. of Aquat. Toxicol.** v. 30, p. 367-379, 1994.

COLES, J. A., FARLEY, S. R., PIPE, R. K., Alteration of the immune response of the common marine mussel *Mytilus edulis* resulting from exposure to cadmium. **Dis. Aquat. Org.** v. 22, p. 59-65, 1995.

DAILIANIS, S.; DOMOUHTSIDOU, G. P.; RAFTOPOULOU, E.; KALOYIANNI, M.; DIMITRIADIS, V. K. Evaluation of neutral red retention assay, micronucleous test, acetylcholinesterase activity and signal transduction molecule (cAMP) in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (L.), in pollution monitoring. **Mar. Environ. Res.** v. 56 (4) p. 443-470, 2003.

DIMITRIADIS, V. K.; DOMOUHTSIDOU, G. P.; RAFTOPOULOU, E. Localization of Hg and Pb in the palps, the digestive gland and the gills in *Mytilus galloprovincialis* (L) using autometallography and X-ray microanalysis. **Environm. Pollut.** v. 125, p. 345-353, 2003.

DINIZ, M. S., PERES, I., PIHAN, J. C. Comparative study of the estrogenic responses of mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed to treated municipal sewage effluent (Lisbon) during two periods in different seasons. **Sci. Tot. Environ.** v. 349, p. 129-139, 2005.

DONDERO, F., DAGNINO, A., JONSSON, H., CAPRI, F., GASTALDI, L., VIARENGO, A. Assessing the occurrence of a stress syndrome in mussels (*Mytilus edulis*) using a combined biomarker/ gene expression approach. **Aquat. Toxicol.** v. 78, p. S13– S24, 2006.

DYRYNDA, E. A., LAW, R. J., DYRYNDA, P. E. J., KELLY, C. A., PIPE, R. K., GRAHAN, K. L., RATCLIFFE, N. A. Modulations in cell-mediated immunity of *Mytilus edulis* following the “Sea Empress” oil spill. **J. of Mar. Bio. Assess.** v. 77, p. 281-284, 1997.

ENVIRONMENT CANADA, **Wastewater collection systems survey**. Unpublished data. Ottawa, Ontario, 1997.

ENVIRONMENT CANADA, **Municipal water use database (MUD)**. Ottawa, Ontario, 1999

ENVIRONMENT CANADA, The state of municipal wastewater effluents in Canada. **Indicators and assessment office, Environmental Conservation Service**, p. 1-67, 2001.

FERRARI, B., PAXÉUS, N., GIUDICE, R. L., POLLIO, A. Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters; study of carbamazepine, clorifibic acid, and diclofenac. **Ecotox. Environm. Saf.** v. 55, p. 359-370, 2003.

FRANCHINI, A., FONTANILI, P., OTTAVIANI, E. Invertebrate immunocytes: relationship between phagocytosis and nitric oxide production. **Comp. Biochem. Physiol.** Part 110B, v. 2, p. 403-407, 1995.

FRIES, C. R., TRIPP, M. R. Depression of phagocytosis in *Mercenaria* following chemical stress. **Dev. Comp. Immunol.** v. 4, p. 233-244, 1980.

GAGNÉ, F., BLAISE, C., AOYAMA, I., LUO, R., GAGNON, C., COUILLARD, Y., CAMPBELL, P., SALAZAR, M. Biomarker study of a municipal effluent dispersion plume in two species of freshwater mussels. **Environ. Toxicol.** v. 17, p. 149-159, 2002.

GAGNON, C., GAGNÉ, F., TURCOTTE, P., SAULNIER, I., BLAISE, C., SALAZAR, M. H., SALAZAR, S. M. Exposure of caged mussels to metals in a primary-treated municipal wastewater plume. **Chemosphere** v. 62(6), p. 998-1010, 2006.

GERACITANO, L., MONSERRAT, J. M., BIANCHINI, A. Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. **J. of Exper. Mar. Biol. and Eco.** v. 277, p. 145-156, 2002.

GÓMEZ-MENDIKUTE, A., ELIZONDO, M., VENIER, P., CAJARAVILLE, M. P.,. Characterization of mussel gill cells in vivo and in vitro. **Cell Tis. Resear.** v. 321, p. 131-140, 2005.

GRUNDY, M. M., RATCLIFFE, N. A., MOORE, M. N., Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mar. Environ. Resear.** 42, 1-4, 186-190. 1996 (a).

GRUNDY, M. M., MOORE, M. N., HOWELL, S. M., RATCLIFFE, N. A. Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. **Aquat. Toxicol.** v. 34, p. 273-290, 1996 (b).

HINTON, D. E.; BAUMANN, P. C.; GARDNER, G. R.; HAWKINS, W. E.; HENDRICKS, J. D.; MURCHELAN, R. A.; OKIHIRO, M. S. Histopathologic biomarkers. In: **Biomarkers: Biochemical, Physiological, and Histological Markers of Antropogenic Stress**. Lewis Publishers p. 155-208, 1992.

HOEGER, B., VAN Den HEUVEL, M. R., HITZFELD, B. C., DIETRICH, D. R. Effects of treated sewage on immune function in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquat. Toxicol.** v. 70, p. 345-355, 2004.

IBGE. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa Nacional de Saneamento Básico ,2000**. Site visitado: Outubro/2004.

<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>

JJEMBA, P. K. Excretion and ecotoxicity of pharmaceuticals and personal care products in the environment. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** v. 63, p. 113-130, 2006.

KHESSIBA, A., ROMÉO, M., AÏSSA, P. Effects of some environmental parameters on catalase activity measured in the mussel (*Mytilus galloprovincialis*) exposed to lindane. **Environ. Pollut.** v. 133, p. 275-281, 2005.

KUMAZAWA, N. H., MORIMOTO, N., OKAMOTO, Y. Luminol-dependent chemiluminescence of haemocytes derived from marine and estuarine molluscs. **J. Vet. Med. Sci.** v. 55, p. 287-290, 1993.

LI, Q., YEO, M. H., TAN, B. K. Lipid peroxidation in small and large phospholipids unilamellar vesicles induced by water-soluble free radical sources. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 273, p. 72-76, 2000.

LIVINGSTONE, D. R., GARCIA MARTINEZ, P., MICHEL, X., NARBONNE, J. F., O'HARA, S., RIBERA, D.; WINSTON, G. W. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other mollusks. **Funct. Ecol.** v. 4, p. 415-424, 1990.

LIVINGSTONE, D. R., LIPS, F., GARCIA MARTINEZ, P., PIPE, R. K. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Biol.** v. 112, p. 265-276, 1992.

LÓPEZ, C., CARBALLAL, M. J., AZEVEDO, C., VALLALBA, A.,. Morphological characterization of the hemocytes of the clam *Ruditapes decussatus* (Mollusca: Bivalvia). **J. of Invert. Pathol.** v. 69, p. 51-57, 1997.

LOWE, D. M. Alterations in cellular structure of *Mytilus edulis* resulting from exposure to environmental contaminants under field and experimental conditions. **Mar. Ecol. Progr. Ser.** v. 46, p. 91-100, 1998.

LOWRYS, O . H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A .L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v 193 p 265, 1951.

MANTIS, I., VOUTSA, D., SAMARA, C. Assessment of the environmental hazard from municipal and industrial wastewater treatment sludge by employing chemical and biological methods. **Ecotoxicol. Environm. Saf.** v. 62, p. 397-407, 2005.

MARIGÓMEZ, I.; LURRAINE, B. Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemical. **Aquat. Toxicol.** v. 64, p. 235-257, 2003.

MARTTINEN, S. K.; KETTUNEN, R. H.; RINTALA. J. A. Occurrence and removal of organic pollutants in sewages and landfill leachates. **The Sci. of T. Environ.** v. 301 p. 1-12, 2003.

MAYRAND, E., ST-JEAN, S. D., COURTENAY, S. C. Haemocyte responses of blue mussels (*Mytilus edulis* L.) transferred from a contaminated site to a reference site: can the immune system recuperate? **Aquacult. Resear.** v. 36, p. 962-971, 2005.

MCHENERY, J. G.; BIRKBECK, T. H. Inhibition of filtration in *Mytilus edulis* L. by marine vibrios. **J. of Fish. and Dis.** v. 9, p. 249-256, 1986.

MIAO, X., BISHAY, F., CHEN, M., METCALFE, C. D. Occurrence of antimicrobials in the final effluent of wastewater treatment plants in Canada. **Environm. Sci. Technol.** v. 38, p. 3533-3541, 2004.

MOLES, A., HALE, N. Use of physiological responses in *Mytilus trossulus* as integrative bioindicators of sewage pollution. **Mar. Pollut. Bull.** v. 46, p. 954-958, 2003.

MOORE, M. N., ALLEN, J. I., MC VEIGH, A. Environmental prognostics: An integrated model supporting lysosomal stress responses as predictive biomarkers of animal health status. **Mar. Environ. Resear.** v. 61, p. 278-304, 2005.

MOORE, M. N., ALLEN, J. I., SOMERFIELD, P., Autophagy: role in surviving environmental stress. **Mar. Environ. Resear.** v. 62, p. S420-S425, 2006.

MORTENSEN, S. H., GLETTE, J. Phagocytic activity of scallops (*Pecten maximus*) hemocytes maintained in vitro. **Fish Shellf. Immunol.** v. 6, p. 111-121, 1996.

MØHLENBERG, F.; RIISGÅD, H. U. Efficiency of particle retention in thirteen species of suspension feeding bivalves, **Ophelia**, v. 7, p. 239-246, 1977.

MYERS, M., ANULACION, B., FRENCH, B., HOM, T., REICHERT, W., HUFNAGLE, L., COLLIER, T. Biomarker and histopathologic responses in flatfish following site remediation in Eagle Harbor, WA. **Mar. Environm. Res.** v. 50, p. 435-436, 2000.

MYERS, M. S.; FOURNIE, J. W. Histopathological Biomarkers as Integrators of Anthropogenic and Environmental Stressors. *In*: Adams, S. M **Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, USA, p 221-287, 2002.

NAJLE, R., ELISSONDO, M., GENTILE, S., GENTILE, M., VACAREZZA, G., SOLANA, H. Histopathology of the digestive gland of an Antarctic limpet exposed to cadmium. **The Scienc. of T. Environ.** v. 247, p. 263-268, 2000.

NANTEL, M. Troubled waters: municipal wastewater pollution on the Atlantic Coast. **Environment Probe Publication** p.1-23, 1996.

NATIONAL WATER RESEARCH INSTITUTE. Informações retiradas do site: <http://www.nwri.ca/factsheets/aeprb-prioritysubstances-e.html>, em Julho/2003.

NICHOLSON, S. Lysosomal membrane stability, phagocytosis and tolerance to emersion in the mussel *Perna viridis* (Bivalvia: Mytilidae) following exposure to acute, sublethal, copper. **Chemosphere**. v. 52, issue 7, p. 1147-1151, 2003.

NIGRO, M., FALLEN, A., DEL BRAGA, I., SCARCELLI, V., LUCCHESI, P., REGOLI, F., FRENZILLI, G. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplants versus native mussels. **Aquat. Toxicol.** v. 77, p. 339-347, 2006.

NOËL, D., BACHÈRE, E., MIALHE, E. Phagocytosis associated chemiluminescence of haemocytes in *Mytilus edulis* (Bivalvia). **Dev. Comp. Immunol.** v. 17, p. 483-493, 1993.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A., VOLLAIRE, Y., SANCHEZ-CHARDI, A., ROCHE, H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Natural Reserve, France. **Aquat. Toxicol.** v.74, p. 53-69, 2005.

OTAVIANI, E., PAEMEN, L. R., CADET, P., STEFANO, G. B. Evidence for nitric oxide production and utilization as a bacteriocidal agent by invertebrate immunocytes. **Environm. Toxicol. and Pharmacol.** v. 248, p. 319-324 1993.

PAINTER, H. G., STEWART, P. L. **An assessment of the environmental quality of Pictou Harbour and surrounding watershed.** A study component of the Pictou Harbour Environmental Action Plan. Environment Canada, Dartmouth, NS. p.1-21, 1992.

PARRY, H. E., PIPE, R. K. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). **Aquat. Toxicol.** v. 69, p. 311-325, 2004.

PELLERIN – MASSICOTTE, J. Oxidative processes as indicators of chemical stress in marine bivalves. **J. of Aquat Ecosys. Health.** v. 3, p. 101- 111, 1994.

PETROVIC, S.; OZRETIC, B.; KRAJNOVIC-OZRETIC, M.; BOBINAC, D. Lysosomal Membrane Stability and Metallothioneins in digestive Gland of Mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lam.) as Biomarkers in Field Study. **Mar. Pollut. Bull.** v. 42 (12), p. 1373-1378, 2001.

PIPE, R. K. Generation of reactive oxygen metabolites by the haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. **Develop. and Compar. Immun.** v.16, p. 111-122, 1992.

PIPE, R. K., COLES, J. A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs. **Fish Shell Immun.** v. 5, p. 581-595, 1995.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; THOMAS, M. E.; FOSSATO, V. U.; PULSFORD, A. L. Evidence for environmentally derived immunomodulation in mussels from the Venice Lagoon. **Aquat. Toxicol.** v. 32, p. 59-73, 1995.

PIPE, R. K., COLES, J. A., CARISSAN, F. M. M., RAMANATHAN, K. Copper induced immune modulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. **Aquat. Toxicol.** v.46, p. 43-54, 1999.

POWER, A., SHEENAN, D. Seasonal variation in the antioxidant defence system of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*. **Compar. Biochem. and Physiol.** Part 114C, v. 2, p. 99-103, 1996.

RABITTO, I. S., ALVES COSTA, J. R. M., SILVA DE ASSIS, H. C., PELLETIER, É.; AKAISHI, F. M., ANJOS, A., RANDI, M. A. F., OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v. 60, p.147-156, 2005.

REBELO, M. F.; RODRIGUEZ, E. M.; SANTOS, E. A.; ANSALDO, M. Histopathological changes in gills of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Crustacea- Decapoda) following acute exposure to ammonia. **Compar. Biochem. and Physiol.** v. 125, p. 157-164, 2000.

ROY, P. S., WILLIAMS, R.J., JONES, A. R., YASSINI, I., GIBBS, P. J., COATES, B., WEST, R. J., SCANES, P. R., HUDSON, J. P., NICHOL, S. Structures and Fuction of South-east Australian Estuarines. **Estuarine, Coastal and Shelf Science** v. 53, p. 351-384, 2001.

SAUVÉ, S., BROUSSEAU, P., PELLERIN, J., MORIN, Y., SENÉCAL, L., GOUDREAU, P., FOURNIER, M. Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn). **Aquat. Toxicol.** v. 58, p. 189-200, 2002.

SMITH, K. L., GALLOWAY, T. S., DEPLEDGE, M. H. Neuro-endocrine biomarkers of pollution-induced stress in marine invertebrates. **The Sci. of the T. Environm.** v. 262, p. 185-190, 2000.

SNYMAN, R. G., REINECKE, A. J., REINECKE, S. A. Quantitative changes in the digestive gland cells of the snail *Helix aspersa* after exposure to the fungicide copper oxychloride. **Ecotoxicol. Environmen. Saf.** v. 60, p. 47-52, 2005.

SOLÉ, M.; PORTE, C.; BARCELÓ, D. Analysis of the estrogenic activity of sewage treatment works and receiving waters using vitellogenin induction in fish as biomarker. **Trends in Analyt. Chem.** v. 20 (9) p. 518-525, 2001.

STATISCS CANADA. Informações retiradas do site: <http://www.statcan.ca/start.html>, em Julho/2005.

ST-JEAN, S. D., PELLETIER, É., COURTENAY, S. C. Very low levels of waterborne butyltins modulate hemocyte function in the blue mussels *Mytilus edulis*. **Mar. Ecol. Progr. Ser.** v. 236, p. 155-161, 2002 (a).

ST-JEAN, S.D., PELLETIER, É., COURTENAY, S. C. Hemocyte functions and bacterial clearance affected *in vivo* by TBT and DBT in the blue mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Ecol. Progres. Ser.** v. 236, p. 163-178, 2002 (b).

ST-JEAN, S. D., COURTENAY, S. C., PARKER, R. W. Immune modulation in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to a pulp and paper mill effluent in Eastern Canada. **Wat. Qual. Resear. J. of Can.** v. 38, n. 4, p. 647-666, 2003.

SUNILA, I. Chronic Histopathological effects of short-term copper and cadmium exposure on the gill of the mussel, *Mytilus edulis*. **J. of Invert. Pathol.** v. 47, p.125-142, 1986.

SUNILA I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea). **Ann. Zool. Fennici** v. 24, p.55-69, 1987.

SURESH, K., MOHANDAS, A. Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. **J. of Invert. Pathol.** v.55, n. 3, p. 325-331, 1990.

SYASINA, I. G.; VASCHENKO, M. A.; ZHADAN, P. M. Morphological alterations in the digestive diverticula of *Mizuhopectan yessoensis* (Bivalvia: Pectinidae) from polluted areas of Peter the Great Bay, sea of Japan. **Mar. Environm. Res.** v. 44, p. 85-98, 1997.

TAFALLA, C., NOVOA, B., FIGUERAS, A. Production of nitric oxide by mussel (*Mytilus galloprovincialis*) hemocytes and effect of exogenous nitric oxide on phagocytic functions. **Comp. Biochem. and Physiol.** Part B, v. 132, p. 423-431, 2002.

TILTON, F.; BENSON, W. H.; SCHLENK, D. Evaluation of estrogenic activity from a municipal wastewater treatment plant with predominantly domestic input. **Aquat. Toxicol.** v. 61, p. 211- 224, 2002.

TORRES, M. A., TESTA, A. P., GÁSPARI, C., MASUTTI, M. B., PANITZ, C. M., CURI-PEDROSA, R., ALMEIDA, E. A., DI MASCIO, P., WILHELM FILHO, D. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil. **Mar. Pollut. Bull.** v. 44, p. 923-932, 2002.

US Bureau of the Census, International Data Base. Total midyear population for the world: 1950-2050. Internet site: <http://www.census.gov/ipc/www/worldpop.html> (2003).

US EPA. Short-term method for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth Edition, October. Office of water, U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, DC, 2002.

WEDDERBURN, J.; MC FADZEN, I.; SANGER, R. C.; BEESLEY, A.; HEATH, C.; HORNSBY, M.; LOWE, D. The field application of cellular and physiological biomarkers, in mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. **Mar. Pollut. Bull.** v. 40, p. 257-267, 1999.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical & Medicine**, v. 25, n.4/5, p. 434-456, 1998.

WINSTON, G. W.; MOORE, M. N.; KIRCHIN, M. A.; SOVERCHIA, C. Production of reactive oxygen species by haemocytes from marine mussel, *Mytilus edulis*: Lysosomal localization and effect of xenobiotics. **Compar. Biochem. and Physiol.** Part C, v. 113, n. 2, p. 221-229, 1996.

ZAR, J. H., **Biostatistical Analysis**. Prentice-Hall Inc., Englewood Cliffs, N.J., 1996.

ZORITA, I., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M., SOTO, M., CAJARAVILLE, M. P. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. **Aquat. Toxicol.**, v. 78, p. S109-S116, 2006.

ZHU, L., GUNN, C., BECKMAN, J. S. Bactericidal activity of peroxynitrite. **Arch. of Biochem. Biophys.** v. 289, p. 452-457, 1992.

ANEXOS

Preparação das Soluções para os ensaios imunes

TBS (tampão trizma salino) – manter refrigerado

Para 500 ml de TBS à 1000-1200 mOsm pH 8,4:

- 12,5 g NaCl
- 12,3 g Trizma base
- Medir pH e adicionar HCl para ajustar

Outra maneira de preparar:

- 17,3 ml de 0,1 N HCl (1,85 g) complementa até 100 ml com água destilada;
- 25 ml de 0,2 M trizma base aquosa e NaCl 2,5% (p/v)

FIXADOR PARA HEMOLINFA (Baker formol) Manter refrigerado

- 4% Formol
- 2% (p/v) NaCl
- 1% Acetato de cálcio
- 93% TBS

SOLUÇÃO de EXTRAÇÃO (manter refrigerado)

- 1% ácido acético glacial
- 50% etanol
- 49% água destilada

ZIMOSAN NÃO CORADO (Manter congelado)

- 40 mg zimosan em 6 ml de água destilada

ZIMOSAN CORADO (manter congelado)

- 40 mg zimosan em 6 ml de água destilada
- Lavar → Centrifugue (3000 rpm – 5min), descarte o sobrenadante, ressuspensa em tampão fosfato (0,01M pH7,4)
- Repita a lavagem, sempre usando o mesmo volume de solução (6 ml)
- Adicione 100 µl da solução estoque do corante vermelho neutro por ml de solução, misture delicadamente, aqueça (deixe ferver por 1 hora). Preste atenção na evaporação, adicione tampão fosfato para manter o volume da solução. Volume final será sempre o mesmo do inicial (6ml)
- Lave → Centrifugue (3000 rpm – 5 min), descarte o sobrenadante
- Ressuspensa em 1,8% ácido fosfomolibdico (solução dissolvida em água destilada) por 30 min à 4 °C
- Lave em água destilada → Centrifugue (3000 rpm – 5 min), descarte o sobrenadante
- Ressuspensa em 6% amônio heptamolibdato (solução preparada com água destilada) por 1 hora à 4 °C
- Lave com água destilada → Centrifugue (3000 rpm – 5 min), descarte o sobrenadante
- Ressuspensa em tampão fosfato. Volume total = 6 ml

SOLUÇÃO ESTOQUE do VERMELHO NEUTRO (manter em temperatura ambiente)

- 20 mg de vermelho neutro/ ml DMSO

OBS: todas as soluções com DMSO devem ser mantidas à temperatura ambiente

SOLUÇÃO de VERMELHO FENOL (Manter congelado) - PRS

- Uma vez descongelado não pode ser congelado novamente.

- 0,5 mM Dextrose
- 0,56 mM vermelho fenol
- 8,5 U/ml peroxidase II (bovina)

AZUL de TRIPAN (manter refrigerado)

- 5% de azul de tripan em TBS (solução supersaturada)
- Filtrar antes de utilizar.
- Concentração final = 3%

SOLUÇÃO A – concentração de proteína – manter refrigerado

- 2 g de sódio tartrato de potássio
- 10 g de carbamato de sódio

Dissolver todos os reagentes em 500 ml de NaOH 1 M e completa para 1 l com água destilada

SOLUÇÃO B – concentração de proteína – manter refrigerado

- 2 g de sódio tartrato de potássio
- 1 g de sulfato de cobre
- Dissolver em 90 ml de água destilada
- Completar para 100 ml com NaOH 1M

SOLUÇÃO C – concentração de proteína – manter à temperatura ambiente – preparar diariamente

- 1 volume de folin ou reagente fenol ciocalteau
- Dissolver em 15 volumes de água destilada (300 µl de Folin em 4,5 ml de água)

Ensaio Imunológicos

ANEXO 1. ATIVIDADE FAGOCÍTICA

- 1- Adicione 100 µl do fixador (para hemolinfa nos poços considerados como o branco)
- 2- Coloque 100 µl de hemolinfa (1:1 em TBS) da cada mexilhão em 3 poços (réplicas) e nos poços branco e controle.
- 3- Sonifique o zimosan corado com vermelho neutro (para a relação final de 1:100 hemolinfa: partículas de zimosan durante 5 minutos e adicione 10 µl desta solução em cada réplica por indivíduos (3 réplicas e branco)).
- 4- Incube por 30 min
- 5- Lave: centrifugue à 2,500 rpm por 5 minutos
Descarte o sobrenadante e ressuspensa em TBS
Centrifugue, descarte o sobrenadante e ressuspensa em fixador
Adicione 100 µl de fixador em cada poço (fixador -Baker)
- 6- Incube por 30 minutos
- 7- Se a atividade fagocítica não for medida imediatamente: lave (centrifugue, descarte sobrenadante) e ressuspensa em TBS. Ler dentro de 48 h, mantenha refrigerado até leitura
- 8- Se a atividade for lida imediatamente: lave (centrifugue, descarte) e ressuspensa em 100 µl de solução de extração.
- 9- Para controle negativo: Adicione 100 µl de zimosan corado e 100 µl de solução de extração.
- 10- Incube a placa durante 30 minutos
- 11- Ler à 540 nm

Resultados podem ser expressos como mg de zimosan/mg de proteína ou por milhão de células. Para a concentração de zimosan, é feito uma curva com uma concentração conhecida de zimosan. Proteína total medida através do método Lowry

(1951). Método usado expressou resultado como mg de zimosan por 1 um milhão de células

Placa: 3 réplicas por animal; Controle = hemolinfa + fixador + vermelho neutro e zimosan; Controle Negativo = vermelho neutro e zimosan + solução de extração; Branco = célula + solução de extração.

ANEXO 2. PRODUÇÃO de PERÓXIDO de HIDROGÊNIO H_2O_2

- 1- Branco: 100 µl de NaOH
- 2- Adicione 100 µl de hemolinfa em 3 poços por amostra e no branco também.
- 3- Incube por 1 hora
- 4- Centrifugue, descarte supernadante
- 5- Adicione 100 µl de PRS (vermelho fenol, peroxidase) e 5 µl de zimosan não corado (5%) em cada poço
- 6- Incube durante 30 min no escuro
- 7- Controle Negativo: 100 µl PRS + 10 µl of zimosan
- 8- Adicione 20 µl de NaOH 1N, para parar a reação (se não for possível finalizar o ensaio no mesmo dia, deve parar o processo neste passo e ler em 48 h.).
- 9- Ler à 620 nm. Resultados expressos como densidade óptica/milhão de células

Placa: 3 “well” por animal

Branco: hemolinfa+NaOH

Controle Negativo: Zimosan +PRS

ANEXO 3. VIABILIDADE CELULAR

Coloque uma gota de hemolinfa numa lâmina

- 1- Adicione 20 µl de azul de tripan 3%
- 2- Aguarde 10 minutos
- 3- Analise as lâminas em microscópio
- 4- Conte o número total de células e o número de células mortas.

Resultado expresso em %

ANEXO 4. CONTAGEM de HEMÓCITOS

- 1- Adicione 100 µl de fixador
- 2- Adicione 100 µl de hemolinfa (1:1).
- 3- Coloque uma amostra num hemocitômetro e começa-se a contagem da células. Contar os dois lados do hemocitômetro
- 4- Multiplica o número de células contadas por 10.000 e depois multiplica pelas diluições.

Resultados expressos como média de 2 campos de contagem.

CONCENTRAÇÃO de PROTEÍNA – LOWRY et al., 1951

- 1- Coloque 100 µl de hemolinfa(1:1 em TBS) em cada poço (duplicata)
- 2- Coloque 100 µl da proteína padrão (albumina) com diferentes concentrações – curva de calibração.
- 3- Adicione 50 µl da solução A em cada “well”.
- 4- Incube a 50°C durante 10 minutos
- 5- Adicione 10 µl da solução B
- 6- Incube por 10 min à temperatura ambiente
- 7- Adicione 75 µl da solução C
- 8- Incube por 10 min até 50°C
- 9- Ler a 620 nm

TBS (µl)	BSA(µl)	Conc. Prot (mg/ml)
100	0,00	0,0
87,5	12,5	0,25
75	25,0	0,50
62,5	37,5	0,75
50	50	1,0
37,5	62,5	1,25
25,0	75	1,50
12,5	87,5	1,75
0,0	100	2,0

ANEXO 5. ÓXIDO NÍTRICO – Protocolo

REAGENTES:

→ NEDD (N-(1 Naftil) etilenediamina) – 0,1% (p/v) (Bom por 15 dias)

0,1 g em 100 ml dH₂O

→ SULF (sulfanilamida) – 2% (p/v) (Bom por 15 dias)

2 g em 95 ml de dH₂O + 5 ml de HCl (1M)

→ Zimosan solução estoque – 20 mg/ml

20 mg de zimosan em 1 ml de água salgada filtrada. Manter congelado!

→ NMMA (N^G- metil-L-arginina) – 10 mM

MW= 248,3 g 0,248 g em 100 ml de TBS

Manter congelado!

Concentração Final = 1mM

→ Solução de nitrito de sódio (solução estoque = 200 µM)

0,00138 g em 100 ml dH₂O

Curva

Conc Nitrito	Vol. Nitrito sol	Vol dH ₂ O
0 µM	0 µl	100 µl
10 µM	5 µl	95 µl

25 μ M	12,5 μ l	87,5 μ l
50 μ M	25 μ l	75 μ l
100 μ M	50 μ l	50 μ l
150 μ M	75 μ l	75 μ l
200 μ M	100 μ l	0 μ l

METODOLOGIA

→ Amostrar um total de 800 μ l de hemolinfa por animal.

Para a concentração de nitrito na hemolinfa exposta ao esgoto: 100 μ l X 3 réplicas
= 300 μ l

Para a concentração de nitrito na hemolinfa exposta ao esgoto e estimulada pelo
zimosan: 100 μ l X 2 réplicas= 200 μ l

Controle Negativo 1= hemolinfa +inibidor (NMMA) = 100 μ l

Controle Negativo 2= Hemolinfa+zimosan +NMMA = 100 μ l

Branco= hemolinfa+ água salgada filtrada = 100 μ l

→ Distribua a hemolinfa nas microplacas e então adicione 10 μ l de NMMA (10 mM) em cada um dos “well” dos negativos.

→ Incube a hemolinfa por 30 minutos.

→ Adicione o zimosan nos poços contendo as amostras que serão estimuladas

→ Incube por 2 horas

→ Depois de 2 horas, transfira 100 μ l de cada poço para uma nova microplaca.

→ Adicione 100 μ l de SULF e 100 μ l de NEDD.

→ Aguarde de 10 a 15 minutos e leia a 540 nm.

→ Resultados expressos em concentração de nitrito (μ M). Para isso, é necessário uma curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio.

ANEXO 6. MICROSCOPIA DE LUZ

Fixação

-As brânquias e glândulas digestivas foram fixadas em:

ALFAC:

85 ml Álcool 80%

10 ml Formol 40%

5 ml ácido acético glacial.

Tempo: 16 horas

Desidratação

1:30 álcool 70%

1:30 álcool 80%

1:30 álcool 90%

1:30 álcool 95%

30 min álcool 100%

30 min álcool 100%

30 min álcool 100%

Diafanização

1:00 Álcool 100% + Xilol (1:1)

1:00 Xilol

1:15 Xilol

Inclusão

2 banhos de 2 h em Paraplast plus em incubadora (58 °C)

Coloração

- Hematoxilina e Eosina

Desparafinização

5 min Xilol I

5 min Xilol II

Hidratação

5 min álcool 100%

5 min álcool 100%

5 min álcool 90%

5 min álcool 70%

Água destilada para lavar

Coloração

Hematoxilina 1 min 20 seg

Eosina 30 seg

Desidratação

Lavar rápido em álcool 70%

20 seg álcool 90%

5 min álcool 100%

5 min álcool 100%

Lamínula

5 min Xilol I

5 min Xilol II

Resina Permout e lamínula.

- Fontana Masson

SOLUÇÃO DE PRATA AMONICAL

Dissolver 10g de nitrato de prata em 100 ml de água destilada. Separar 95ml desta solução e nesta adicionar o hidróxido de amônia em gotas. As gotas clareiam a solução

que se encontrava previamente precipitada. Se a solução ficou clara utilize 5 ml de nitrato de prata para torna - lá um pouco turva. Deixe em repouso por uma noite.

Desta solução pronta para uso, utilize 25 ml e acrescente 75ml de água destilada e filtre.

SOLUÇÃO CORANTE DE SAFRANINA

0,1 g de Safranina

100 ml Água destilada

1,0 ml de ácido acético glacial

SOLUÇÃO DE CLORETO DE OURO

10 ml de uma solução estoque de cloreto de ouro 1%

40 ml de água destilada

SOLUÇÃO DE TIOSSULFATO DE SÓDIO 5%

5 g de tiossulfato de sódio

100ml de água destilada

PROCEDIMENTO

- 1- Desparafinizar e hidratar o material até água destilada (como a coloração de hematoxilina e eosina)
- 2- Colocar os cortes numa solução de nitrato de prata/amoniaco filtrada, e incubar por 1h a 56°C para impregnação. Os cortes tornam-se marrons claros.
- 3- Enxaguar em água destilada
- 4- Submeter as lâminas a uma solução de cloreto de ouro 0,2% por 10 min
- 5- Enxaguar em água destilada (3 vezes)
- 6- Incubar as lâminas em tiossulfato de sódio 5% (reação de redução) por 5 min

- 7- Enxaguar em água destilada (3 banhos)
- 8- Corar os núcleos com a solução corante safranina por 5 min
- 9- Enxaguar em água destilada (2 banhos)
- 10- Desidratar, diafanizar e montar

ANEXO 7. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fixador

Glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 1M pH 7.2- 7.4 durante 24 h.

Desidratação

- 10 min álcool 70%
- 10 min álcool 80%
- 10 min álcool 90%
- 10 min álcool 95%
- 10 min álcool absoluta

ANEXO 8. MEDIDA DA ATIVIDADE DA CATALASE

Calibração para Catalase (Cohen et al, 1996, adptado e modificado)

Este método mede H_2O_2 colorimetricamente seguindo o princípio de reação entre íons férrico e tiocianeto. H_2O_2 reage com íons ferroso e o resultado é a formação de íons férricos, e com a adição do tiocianeto, estes reagem em conjunto formando um complexo que apresenta coloração vermelha, sendo possível leitura num pico entre 450-480 nm. Com esta técnica é possível medir quanto H_2O_2 foi degradado pela catalase.

Reagentes

→ Tampão fosfato de sódio pH 7.0 50 mM (100 ml diariamente)

a- 6,81 g KH_2PO_4

b- 8,9 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

- Completa para 1000 ml com água destilada para cada solução (a e b)
- Misture a 2 soluções na proporção de 1:1.5 (v/v)

Todas essas soluções abaixo estão presentes no tampão (essa mistura é feita diariamente).

→ 0,1% Triton X100 (0,1ml em 100 ml de tampão)

→ 0,6 M NaCl (3,51 g em 100 ml de tampão)

→ 0,5 M Sucrose (17,5 g em 100 ml de tampão)

→ 0,3 mM PMSF (Fenilmetilsulfonilfluor) (Feito diariamente) (0,0522 g em 100 ml de tampão)

→ 0,05 mM inibidor Tripsina (feito diariamente)

→ Solução estoque de peróxido de hidrogênio (60 mM)

- Peróxido de hidrogênio precisa ser diluído, através da adição de 0,034 ml (34 μl) de 3% peróxido de hidrogênio em 50 ml de água destilada.

→ Solução de Tiocianeto de potássio (KSCN – PM= 97,18g) 2,5M (dissolva em água) = 12,147 g em 50 ml de água destilada

→ Solução de Sulfato de Ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – PM= 278,01g) 10 mM (dissolva em água) = 0,139 g em 50 ml de água destilada.

→ Solução estoque de ácido sulfúrico (H_2SO_4 – PM=98,08) 0,6 N (dissolva em água) – mantenha sempre a temperatura ambiente = 1 N= 49,04 g em 1 L. = 60 ml em 40 ml de água destilada.

TODOS OS REAGENTES DEVEM SER MANTIDOS A 0°C OU EM GELO.

→ Albumina soro bovina (para curva padrão – concentração de proteína)

→ Solução A, B, e C para determinação da concentração de proteína.

Material

- Balança
- Ependorfes
- Nitrogênio líquido
- -70 °C - freezer
- Homogenizador
- Centrífuga refrigerada para ependorfes (4°C)
- Microplacas
- Espectrofômetro (492 nm)

METODOLOGIA

Preparo das amostras:

- 1- Coletar brânquias e glândula digestivas dos mexilhões
- 2- Pesa cada um dos órgãos e os mantenham em tubos ou ependorfes
- 3- Congele em nitrogênio líquido ou coloque diretamente em freezer (– 70°C), até análise
- 4- Homogenize os tecidos em tampão fosfato de sódio, contendo Triton X100, Sucrose, PMSF, NaCl e Trypsina. Dilua as amostras de 1:5 (p/v) em tampão
- 5- Centrifugue o homogenado durante 10 min a 10,000 Xg a 4°C
- 6- Trabalhe sempre em ambiente frio ou em gelo (4°C)
- 7- Colete o sobrenadante

Medida da atividade da catalase

Teste diferentes diluições (sem diluir, 1:10, 1:20, 1:50 e 1:100) → uma vez encontrada a diluição correta para brânquias e glândula de *M. edulis*, utilizar a mesma para todas as amostra. Neste estudo a melhor diluição foi 1:5.

Adicione H_2O_2 somente depois de ter adicionado as seguintes soluções na microplaca. Não esquecer de sempre trabalhar no gelo.

- 1- Colocar na microplaca: 218 μl de H_2SO_4 (0.6 N) em cada poço + 54 μl de FeSO_4 (10 mM)
- 2- Então, pode-se adicionar H_2O_2 no sobrenadante já diluído. Adicione 10 μl (H_2O_2) e agite gentilmente. O H_2O_2 será adicionado para o controle negativo e positivo

A reação inicia-se após adição de H_2O_2 . Adicione 6 μl do sobrenadante (com H_2O_2) em cada poço (duplicata para cada intervalo de tempo). A atividade é medida nos seguintes intervalos de tempo: 1, 3, 5, 7 e 9 minutos.

Adicione 22 μl de KSCN 2,5 M em cada poço para desenvolver a coloração. Manter a microplaca coberta com papel alumínio ou em ambiente sem luz.

- 3- Ler a 492 nm em temperatura ambiente. Fazer apenas uma leitura.
- 4- Adicione 100 μl do sobrenadante (sem H_2O_2) – teste diferente diluições - em 2 poços, para estabelecer a concentração de proteína
- 5- Quantifique proteína total através do método de Lowry (1951) utilizando albumina soro bovina como padrão. Amostras diluídas 1:20.
- 6- Leitura a 620 nm, para concentração de proteína

Os resultados são expressos em termo da taxa constante de primeira ordem de reação (k), calculado como a seguir:

$$\text{Uma unidade de catalase} = [\ln (A_1/A_2) / (t_1/t_2)] / \text{mg proteína}$$

Onde \ln é o log natural, A_1 é a absorbância no tempo 1 (t_1) e subsequente períodos. Neste caso será analisado em dois tempos (1 e 9) e t será = 8 min.

ANEXO 9. DESAFIO BACTERIOLÓGICO: PREPARO DE MEIOS DE CULTIVO

Meio de cultivo – TSA (Trypticase Soy agar) Temperatura: 44 °C

20 g TSA em 500 ml de água destilada

Adicione 10 g de NaCl. Concentração final= 2%

Pese TSA, coloque num recipiente (garrafa de 1 L pyrex, ou enlemeyer de 1 L), adicione 500 ml de água, misture utilizando agitador magnético. Aqueça até começar a ferver, deixar ferver por 1 minuto.

Autoclavar por 15 minutos. Importante: nunca autoclavar recipiente completamente vedado!!!! Após autoclave todo processo deve ser realizado em fluxo laminar.

1 L de meio é suficiente para 30 placas espessas.

Estreptomicina

Adicione a estreptomicina ao meio de cultivo, após autoclavado.

Prepare o meio com as seguintes concentrações: 100 mg/l; 250 mg/l 500 mg/l.

Rifampicina

Adicione a rifampicina ao meio de cultivo com 500 mg/l de estreptomicina.

Concentrações de 20 mg/l, 60 mg/l e 100 mg/l

Marine Broth

Prepare o meio seguindo instruções da companhia.

O meio deve ter 500 mg/l de estreptomicina e 100 mg/l de rifampicina e 10 mg/l de fungicida

ANEXO 10.

Tabela. Parâmetros físicos e químicos em áreas recebendo o esgoto tratado e não tratado e em amostras do esgoto coletado na central de tratamento de esgoto. t: temperatura, CS: condutividade específica, SST: suspensão sólida total, P:fosfato NH₃: amônia, NO₃:nitrato, Cl: cloro, SO₄: sulfato, BOD: demanda biológica de oxigênio. Número representam um média dos meses de maio, julho e agosto 2005. ND= não detectável.

	Testes físico-químicos									
Áreas	T		CS	SST	P	NH ₃	NO ₃	Cl	SO ₄	BOD
	(°C)	pH	µS/cm	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
REF	16,0	7,9	40466	35,6	0,051	ND	ND	16260	2225	-----
PS	16,6	7,9	35100	13,33	0,071	ND	ND	15483	2206	----
ER	19,3	7,8	31900	21,26	0,094	0,05	0,25	11837	16635	---
Esgoto	-----	7,23	4970	9,33	1,22	0,45	8,85	627,6	110,6	9

REF= áreas de referência; PS = áreas recebendo esgoto não tratado; ER = áreas recebendo esgoto tratado; WWTP = amostras de águas provenientes da estação de tratamento de esgoto.

Fonte: Environment Canada. Projeto: Quantificação de produtos farmacêuticos no esgoto e áreas que recebem esgoto na Costa Atlântica Canadense.